

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



ESTUDIO DEL VIRUS JC, AGENTE CAUSAL DE LA
LEUCOENCAFALOPATÍA MULTIFOCAL PROGRESIVA, EN PACIENTES
DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE RECURRENTE-REMITENTE TRATADOS
CON NATALIZUMAB

TESIS DOCTORAL DE:

MARÍA INMACULADA DOMÍNGUEZ MOZO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**ROBERTO ÁLVAREZ LAFUENTE
RAFAEL ARROYO GONZÁLEZ**

Madrid, 2013

©María Inmaculada Domínguez Mozo, 2013



FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**ESTUDIO DEL VIRUS JC, AGENTE CAUSAL
DE LA LEUCOENCEFALOPATÍA
MULTIFOCAL PROGRESIVA, EN PACIENTES
DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE RECURRENTE-
REMITENTE TRATADOS CON NATALIZUMAB**

**Tesis doctoral presentada por María Inmaculada Domínguez Mozo bajo la
dirección del Dr. Roberto Álvarez Lafuente y del Dr. Rafael Arroyo González**

Unidad de Esclerosis Múltiple del Hospital Clínico San Carlos de Madrid
Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IDISSC)

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	9
I INTRODUCCIÓN	31
1. EM	33
1.1 Diagnóstico	33
1.2 Formas clínicas	35
1.3 Valoración clínica del paciente.....	36
1.4 Epidemiología de la EM	37
1.5 Etiología	38
1.6 Patología de la EM	43
2. TRATAMIENTOS PARA LA EM	46
2.1 Introducción.....	46
2.2 Natalizumab.....	49
3. LMP	57
3.1 Historia	57
3.2 Diagnóstico	58
3.3 Tratamientos	60
4. VIRUS JC	62
4.1 Taxonomía.....	62
4.2 Estructura/genoma	62
4.3 Variantes	64
4.4 Ciclo de vida del poliomavirus.....	67
4.5 Vías de entrada al cerebro	69
4.6 Transactivación viral	74
4.7 Métodos para detectar el virus JC.....	74
4.8 Respuesta del sistema inmune frente al virus JC.....	77
II HIPÓTESIS	79
III OBJETIVOS	83

IV MATERIALES Y MÉTODOS	87
1. SELECCIÓN DE PACIENTES	89
2. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS	90
2.1 Estudio de la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab (qPCR)	90
2.2 Estudio comparativo de técnicas de detección del virus JC (doble ELISA vs qPCR)	92
2.3 Estudio de la posible asociación entre el HLA clase II y la reactivación del virus JC durante el tratamiento con natalizumab	93
2.4 Estudio de la posible transactivación del virus JC por el HHV-6 durante el tratamiento con natalizumab	94
3. ANÁLISIS DE MUESTRAS	96
3.1 Extracción de ADN de PBMCs, suero, orina y LCR	96
3.2 Detección de ADN del virus JC mediante qPCR	97
3.3 GENOTIPADO DEL HLA clase II	98
3.4 Detección de anticuerpos anti-JC mediante doble ELISA	99
3.5 Determinación de niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6	101
3.6 Clonación y secuenciación	102
4. ESTADÍSTICA	105
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
1. ESTUDIO DE LA REACTIVACIÓN DEL VIRUS JC A LO LARGO DEL TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB (qPCR)	109
1.1 Comparación de los niveles de ADN del virus JC en PBMCs, suero y orina entre la cohorte de controles sanos y la VB (sin tratamiento) de los pacientes de EM	109
1.2 Efecto del natalizumab en la reactivación del virus JC en orina a lo largo del tratamiento	112
1.3 Efecto del tratamiento con natalizumab en la reactivación del virus JC en PBMCs/suero a lo largo del tratamiento	116
2. ESTUDIO COMPARATIVO DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VIRUS JC (DOBLE ELISA VS qPCR)	119
2.1 Estudio de los niveles de ADN viral y anticuerpos anti-JC en función de distintas variables clínicas	119
2.2 Comparación de los resultados de cuantificación del ADN en orina/PBMCs/suero con la detección de anticuerpos anti-JC mediante doble ELISA en el mismo punto del tratamiento en pacientes de EM tratados y no tratados con natalizumab	122

2.3 Segunda medida de anticuerpos-anti-JC	126
2.4 Seroconversión a lo largo de tratamiento con natalizumab en los distintos perfiles de excreción del virus JC en orina.....	127
3. ESTUDIO DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE EL HLA CLASE II Y LA REACTIVACIÓN DEL VIRUS JC A LO LARGO DEL TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB.....	129
4. ESTUDIO DE LA POSIBLE TRANSACTIVACIÓN DEL VIRUS JC POR EL HHV-6 DURANTE EL TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB.....	133
5. VARIANTES DEL VIRUS JC EN PACIENTES CON LMP	137
5.1 Estudio de la carga viral a lo largo del tratamiento con natalizumab.....	139
5.2 Identificación de las variantes del virus JC presentes durante el tratamiento con natalizumab.....	143
VI CONCLUSIONES	153
VII BIBLIOGRAFIA	157

ABREVIATURAS

A, C, G, T	Adenina, citosinas, guanina y timina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFFIRM	Ensayo clínico randomizado en pacientes tratados con natalizumab vs placebo [<i>A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. New England Journal of Medicine</i> . 2006 Mar 2; 354(9):899-910]
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CMV	Citomegalovirus
DO	Densidad óptica
EBV	Virus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr virus</i>)
EDSS	Escala expandida del estado de discapacidad (<i>expanded standard disability statu scale</i>)
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EM	Esclerosis múltiple
EMA	Agencia Europea de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
EMRR	Esclerosis múltiple recurrente remitente
EMSP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EJ	Por ejemplo
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
HHV-6	Herpes virus humano 6 (<i>human herpesvirus 6</i>)
HLA	Antígeno de histocompatibilidad humano (<i>human leukocyte antigen</i>)
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IRIS	Síndrome Inflamatorio de Reconstitución Inmune
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LMP	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
log	Logaritmo decimal en base 10
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>major</i>

	<i>histocompatibility complex)</i>
Nested-PCR	PCR anidada
OR	Odds Ratio
ORI	Origen de replicación
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o cuantitativa
RM	Resonancia magnética
RR	Región reguladora
SENTINEL	Ensayo clínico en pacientes EMRR tratados con natalizumab e interferón beta-1 a. (Natalizumab plus Interferon Beta-1 a for Relapsing Multiple Sclerosis Rudick R. et al. N Engl J Med. 2006 Mar 2; 354 (9): 911-23)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (<i>single-nucleotid polymorphism</i>)
SPSS	Paquete estadístico para ciencias sociales (<i>statistical package for the social science</i>)
TAC	Tomografía axial computarizada
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
TCR	Receptor de células T
V12	Visita en el mes 12 de tratamiento con natalizumab
VB	Visita basal en la que el paciente está sin tratamiento
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC) y cuyo origen es presumiblemente autoinmune, siendo en los países desarrollados la segunda causa de discapacidad entre personas jóvenes después de los accidentes de tráfico.

Durante los últimos años se han desarrollado, o actualmente están en ensayo clínico, una gran cantidad de fármacos para tratar esta patología. Entre todos ellos cabe destacar natalizumab, un anticuerpo monoclonal antagonista de la cadena $\alpha 4$ de la integrina dimerica $\alpha 4/\beta 1$, presente en todos los leucocitos a excepción de los neutrófilos. Su mecanismo de acción consiste en impedir que estas células atraviesen la barrera hematoencefálica hacia el SNC, disminuyendo los procesos inflamatorios que están teniendo lugar en este órgano. Se caracteriza por su gran eficacia clínica comparada con el resto de fármacos del mercado; sin embargo, su administración ha sido asociada con la aparición de varios casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una devastadora enfermedad desmielinizante del SNC causada por el virus JC.

Hasta el 18 de abril de 2013 este fármaco ha sido administrado a más de 100.000 pacientes, entre los cuales se han diagnosticado unos 350 casos de LMP. Para determinar el riesgo de padecer esta enfermedad causada por el virus JC en los enfermos de EM tratados con natalizumab, la empresa farmacéutica que distribuye esta molécula ha elaborado un algoritmo en el que se tienen en cuenta 3 factores de riesgo: presencia/ausencia de anticuerpos anti-JC detectados por doble-ELISA, tiempo de exposición al tratamiento con natalizumab y uso previo de inmunosupresores. De tal forma que, aquellos pacientes que sean positivos a dichos anticuerpos anti-JC, hayan sido previamente tratados con inmunosupresores y hayan estado expuestos al fármaco durante más de 2 años, tendría un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad [1 LMP:94 pacientes de EM tratados con natalizumab (IC: 1:130, 1:70)] frente al resto de grupos. El diagnóstico de la LMP se lleva a cabo mediante imágenes de resonancia magnética (RM), presencia de síntomas clínicos y detección del virus JC mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en líquido cefalorraquídeo (LCR), que suele estar presente en concentraciones muy bajas.

El virus JC es un poliomavirus, no posee envuelta y su cápside icosaédrica alberga en su interior un pequeño genoma de ADN circular de doble hélice. Este genoma está organizado en 3 partes: una región codificante temprana, una tardía y una región reguladora (RR) común situada entre las dos anteriores. Esta RR contiene el origen de replicación (ORI) y los sitios de unión de distintos factores de transcripción que controlan la expresión génica del virus. Además, esta región determina la variante del virus y el tropismo celular del mismo. De esta forma en este trabajo distinguiremos entre: 1) la variante arquetípica: excretada por la orina de una gran parte de la población sana, caracterizada por ser no patogénica y cuya secuencia se divide en 7 fragmentos: ORI-A-B-C-D-E-F, 2) las variantes neurotrópicas, relacionadas con el desarrollo de LMP y compuesta por los mismos fragmentos que la arquetípica pero reordenados, según un patrón de deleciones y duplicaciones aún por determinar (ej: ORI-A-C-E-A-C-E-F1-F2).

Un asunto de gran controversia es el origen de la variante neurotrópica (procedente o no de la arquetípica) y la vía que sigue hasta alcanzar el SNC (en el caso de que no esté ya

allí en estado de latencia). Dos hipótesis han sido consensuadas en la bibliografía. La primera de ellas es conocida como arquetípica: defiende que la infección primaria sería producida por la variante arquetípica, ésta permanecería latente en los riñones (excretándose en ocasiones por la orina) y en condiciones de inmunosupresión los distintos fragmentos de su RR se reordenarían, adquiriendo neurovirulencia y causando LMP cuando alcanzaran el cerebro. La segunda apareció por oposición a la anterior, tras la identificación de la variante neurotrópica en tejidos extraídos de amígdalas, tracto gastrointestinal, médula ósea, cerebro... de individuos sin LMP; con lo cual se abrían posibilidades alternativas, como que el virus neurotrópico circulara en la población humana sana y que además pudiera causar la enfermedad desmielinizante en la infección primaria. Si bien, la hipótesis arquetípica es la más aceptada por la comunidad científica.

En caso de desarrollar LMP, tanto en pacientes de EM tratados con natalizumab como en otro tipo de pacientes inmunosuprimidos, la respuesta de las células CD8+ y las CD4+ parecen críticas para controlar la patología, frente a la existencia de una respuesta humoral ineficaz. De tal forma que, aquellos pacientes de LMP asociada a VIH con una respuesta de células CD8+ antígenoespecífica en la cual el antígeno es presentado con la molécula de HLA clase I codificada por el alelo *HLA-A*0201*, muestran correlación con un buen pronóstico de la LMP.

Por último añadir que, el efecto inmunosupresor de este fármaco, provocado por la disminución de las células T, B y plasmáticas en el LCR de los pacientes tratados, junto con una alteración en la síntesis de inmunoglobulinas, parece sólo afectar a la reactivación patogénica del virus JC. Si bien, no se podría descartar la posible reactivación de otros virus aunque sin alcanzar niveles patológicos. Uno de esos posibles candidatos sería el HHV-6, pues una publicación reciente asocia su reactivación con el tratamiento con natalizumab, además de demostrar in vitro que este virus aumenta significativamente la replicación del virus JC.

HIPÓTESIS

Varios factores podrían estar implicados en el desarrollo de la LMP en pacientes de EM tratados con natalizumab:

- El aumento de la reactivación del virus JC o de su carga viral a lo largo de tratamiento con natalizumab, siendo determinante la técnica utilizada para la detección viral.
- La respuesta inmune específica de cada paciente frente a la reactivación del virus JC.
- La existencia de una posible transactivación del virus JC por HHV-6.
- La presencia de la variante neurotrópica patogénica a lo largo del tratamiento con el anticuerpo monoclonal.

OBJETIVOS

1. Estudio de la reactivación del virus JC en pacientes de EM durante el tratamiento con natalizumab mediante la detección de su ADN por qPCR en muestras de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica), suero y orina.

2. Determinación del grado de concordancia entre los resultados obtenidos con las dos técnicas empleadas para la determinación de aquellos pacientes que están o han estado en contacto con el virus JC: doble-ELISA y qPCR.
3. Análisis de la posible asociación entre el HLA clase II y la presencia del virus JC en PBMCs, suero y orina durante el tratamiento con natalizumab.
4. Estudio de la hipotética transactivación del virus JC por parte del HHV-6 a lo largo del tratamiento con el anticuerpo monoclonal.
5. Determinación de los tipos de variantes del virus JC, neurotrópicas o arquetípicas, presentes en PBMCs, suero, orina y LCR a lo largo del tratamiento con natalizumab en tres pacientes de EM, dos de los cuales desarrollaron LMP.

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTICIPANTES Y DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

En este trabajo se incluyeron 189 pacientes diagnosticados de EM en la Unidad de EM del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (2007-2012). Para alcanzar los objetivos anteriormente planteados estos pacientes fueron agrupados en distintos estudios que pasaremos a desarrollar a continuación, de tal forma que, ciertos pacientes participaron en varios de ellos.

1. Estudio de la reactivación del virus JC durante el tratamiento con natalizumab (qPCR): de cohortes abierto, con 100 pacientes de EM tratados con natalizumab en los que se valoró los niveles de ADN del virus JC mediante qPCR, en muestras de PBMCs, suero y orina en una primera visita basal (VB, sin tratamiento), y posteriormente trimestralmente hasta un mínimo de 6 meses y un máximo de 39. Además se compararon estos mismos niveles virales en la VB con los de una cohorte transversal de controles sanos.
2. Estudio comparativo de técnicas de detección del virus JC (doble-ELISA vs qPCR): transversal, con una población de 82 pacientes de EM tratados con natalizumab y 55 pacientes de EM no tratados con este fármaco en los que se detectó el contacto previo con el virus JC simultáneamente mediante dos técnicas: doble ELISA o doble ELISA de 2ª generación en suero (anticuerpos anti-JC) y qPCR en PBMCs, suero y orina (ADN viral). Además, se valoró el efecto de los siguientes parámetros demográficos y clínicos sobre las antes citadas variables de laboratorio: sexo, edad, tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la EM hasta la extracción de las muestras para la detección de anticuerpos anti-JC y los niveles de ADN viral, tratamiento previo a natalizumab y duración del mismo hasta la extracción de las muestras, y número de meses tratados con el anticuerpo monoclonal.
Por otro lado, 23 de los 82 pacientes tratados con natalizumab y 10 de los no tratados tuvieron una segunda medida de anticuerpos anti-JC (doble ELISA 2ª generación) al año de la primera extracción, junto a una valoración simultánea del ADN viral (qPCR).

3. Estudio de la posible asociación entre el HLA clase II y la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab: se procedió al tipaje del HLA-DRB1 en 90 pacientes de EM con datos sobre la reactivación del virus JC durante el tratamiento con natalizumab.
4. Estudio de la posible transactivación del virus JC por HHV-6 durante el tratamiento con natalizumab: de cohortes abierto, en el que participaron 77 pacientes en los que se midió semestralmente los niveles de IgG e IgM contra el HHV-6 hasta un mínimo de 6 meses y un máximo de 24. Estos pacientes también participaron en el estudio de reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab.
5. Estudio de las variantes del virus JC en pacientes con LMP: de cohortes, en el que se incluyeron 3 pacientes de EM: P56 (no LMP pero con reactivación del virus JC en PBMCs y suero a lo largo del tratamiento con natalizumab), P1004 (LMP tras 2 años con el anticuerpo monoclonal) y P89 (LMP trascurridos 4 años con el fármaco). Se identificaron las variantes virales presentes en PBMCs, suero, orina y LCR durante el tratamiento mediante técnicas de clonación y secuenciación.

TÉCNICAS:

La extracción del ADN de las muestras de PBMCs, suero, LCR y orina se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante de diversos kits de Quiagen, previo ultracentrifugado de las muestras tanto de suero como de LCR. Los *primers* y sonda de la qPCR empleados en este trabajo habían sido descritos con anterioridad, siendo el límite de detección de la técnica en PBMCs de 4 copias/ μ g, en suero y LCR de 17 copias/ml y en orina de 14 copias/ml, tras ponerla a punto en nuestro laboratorio.

El tipaje de los locus *HLA-DRB1* se llevó a cabo mediante la técnica PCR-SSOP y el tipaje de la presencia del principal alelo de susceptibilidad para EM, el alelo *DRB1*15:01*, se realizó mediante ensayo TaqMan ya validado con anterioridad.

Para detectar los anticuerpos anti-JC se envió una muestra de sangre de los pacientes de interés al laboratorio de referencia (Unilabs, Dinamarca), donde se lleva a cabo el test STRATIFY JCV™ (doble ELISA), o el STRATIFY JCV™ DxSelect™ (doble ELISA de 2ª generación).

Los niveles de IgG e IgM anti-HHV-6 se determinaron mediante ELISA (Panbio).

Para la identificación de las distintas variantes presentes en las muestras de P56, P89 y P1004 en primer lugar se procedió a la amplificación de la RR del virus JC de estas muestras mediante una *nested*-PCR previamente descrita. Posteriormente se procedió a la clonación de estos productos de reacción con el Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen™) y finalmente a la secuenciación de los clones obtenidos (un total de 1.174). Para llevar a cabo el análisis de la RR, las secuencias se alinearon y mapearon con la RR de la arquetípica con la ayuda del programa Mutation Surveyor® V4.0.6.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando distintos test estadísticos seleccionados en función del diseño del estudio y de las características de las variables de exposición y

respuesta: categóricas o continuas y paramétricas o no paramétricas, utilizando el paquete estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudio de la reactivación del virus JC durante el tratamiento con natalizumab (qPCR)

- La prevalencia del virus JC en PBMCs y suero de controles sanos y pacientes de EM sin tratar (en la VB del estudio) fue similar, mientras que en orina fue significativamente superior en enfermos ($p=0,007$, test χ^2).

Las características de la qPCR con la que trabajamos, con límites de detección más bajos que en publicaciones previas, explicarían que nuestras prevalencias en la VB de pacientes de EM fueran mayores que las descritas en individuos de características similares.

- Detectamos un aumento significativo de la prevalencia del virus JC y de la carga viral en orina a lo largo del tratamiento con natalizumab, entre la VB y el resto a partir de la V9 (visita en el mes 9 de tratamiento). Además, en función del tipo de excreción del virus JC en orina, dividimos a nuestra población en 3 grupos: excreción permanente (34% de los pacientes), intermitente (52%) o ausente (14%). La carga viral media de todas las visitas a lo largo del tratamiento en el grupo con excreción viral permanente [6,2 (5,2, 6,9) log copias/ml] fue significativamente mayor que la del grupo con excreción intermitente del virus en orina [2,6 (2,2, 3,1) log copias/ml] ($p=8,7 \cdot 10^{-12}$, test U de Mann-Whitney). Siendo en el grupo con excreción intermitente en orina donde se detectó un aumento significativo de la prevalencia y de la carga viral a lo largo del tratamiento.

En la mayoría de los estudios previos no se ha detectado este aumento de la prevalencia viral en orina a lo largo del tratamiento con natalizumab. Probablemente se deba a la mayor sensibilidad de nuestra qPCR, que nos permitió dividir a nuestra cohorte en 3 grupos: 1) excreción del virus JC de forma permanente en orina: con una carga viral significativamente mayor que el resto y que no parece modificarse durante el tratamiento con natalizumab, y cuyo porcentaje coincide con el de la prevalencia del virus publicada por estudios previos; 2) excreción intermitente del virus JC en orina: con una prevalencia y carga viral que aumenta a lo largo del tratamiento; 3) excreción del virus JC ausente en orina.

- En nuestra cohorte de pacientes de EM ($n=100$), un 23% fueron positivos alguna vez a virus JC en PBMCs y/o suero a lo largo del tratamiento con natalizumab. Sólo 4 pacientes fueron positivos simultáneamente en PBMCs y suero a lo largo del tratamiento, de los cuales 2 desarrollaron LMP. Detectamos una cierta tendencia a la reactivación viral en suero en aquellos pacientes con presencia intermitente del virus en orina (21,2%) frente a los que tienen una excreción del virus permanente (6,1%). Esto no ocurrió en PBMCs.

En la mayor parte de los trabajos publicados no se ha detectado el virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab en PBMCs, es decir en estado latente, ni tampoco en suero, lo que implicaría una reactivación del mismo. Probablemente, esto se deba a que la sensibilidad de la qPCR empleada en este estudio fue superior a la publicada previamente.

La existencia de distintos perfiles de excreción del virus en orina: intermitente (donde parece existir mayor probabilidad de detectar el virus en suero), permanente y ausente, podría apuntar a la existencia de diferencias a nivel inmunológico o incluso virológico entre ellos en condiciones de inmunosupresión. Tal vez estas diferencias podrían influir, posteriormente, en un mayor o menor riesgo de padecer LMP.

2. Estudio comparativo de técnicas de detección del virus JC (doble-ELISA vs qPCR)

- En el conjunto de la población de EM, tanto en tratados como en no tratados con natalizumab, la prevalencia de anticuerpos anti-JC fue de un 62,3% y la prevalencia del virus JC en orina de un 59,4%. Ambos parámetros no variaron en función del sexo, de la edad ni del tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad. Se detectaron anticuerpos anti-JC en 4 de los 6 pacientes de EM previamente tratados con inmunosupresores, y el ADN del virus JC únicamente en uno de estos 4 pacientes.

Mientras la seroprevalencia fue comparable a la de estudios anteriores, aunque ligeramente superior, la prevalencia en orina fue considerablemente mayor a la de la literatura, debido a que el límite de detección de nuestra qPCR fue menor que el utilizado en otros estudios previos. Las variables de laboratorio valoradas no parecieron variar en función de las variables clínicas de estudio. Ni siquiera el tratamiento previo con inmunosupresores y largos periodos de tratamiento con el anticuerpo monoclonal parecieron guardar relación con tasas elevadas de prevalencia de anticuerpos anti-JC, probablemente porque el aumento del riesgo de LMP con estos parámetros no está directamente relacionado con una infección por JC de *novo*. Hubo una excepción, se pudo apreciar una tendencia al aumento de la frecuencia de anticuerpos anti-JC y de la prevalencia del ADN viral en orina con la edad, además de una correlación positiva débil no significativa entre edad y carga viral. Estas tendencias han sido descritas con anterioridad y justificarían el seguimiento de estos parámetros durante la administración del fármaco.

- La estimación del grado de concordancia entre los resultados obtenidos mediante las dos técnicas, doble ELISA y qPCR, se llevó a cabo calculando el índice Kappa, que fue 0,41 ($p=4,1E*10^{-6}$, índice Kappa). Dividimos a nuestra población en 4 grupos: qPCR+ dobleELISA+ (47%), qPCR- dobleELISA- (27%), qPCR+ dobleELISA- (12%), qPCR- dobleELISA+ (14%). La carga viral en orina de los 15 pacientes (12%) que sólo fueron positivos con qPCR (2.6 (1.5, 3.5) log₁₀ copias/ml) fue significativamente menor ($p=0.0002$, test U de Mann-Whitney) que la carga viral de los 61 pacientes positivos con las dos técnicas (5 (3,2, 6,6) log₁₀ copias/ml).

En lo que respecta al índice de concordancia entre las dos técnicas, 0,4, se le considera como moderado. De tal forma que, un 26% de la población habría estado en contacto o no con el virus en función de la técnica empleada, similar sólo al de alguna publicaciones previas, que utilizó una qPCR con un límite de detección similar al nuestro. Aquellos pacientes en los que detectamos el virus JC mediante qPCR pero no mediante doble ELISA tuvieron una carga viral significativamente menor que aquellos individuos que fueron positivos para las dos técnicas. Sería interesante comprobar si hay algún tipo de correspondencia también entre la carga viral y los títulos de anticuerpos anti-JC. Respecto a aquellos pacientes que son negativos a anticuerpos anti-JC sería adecuado testar los niveles de ADN viral en orina para comprobar si efectivamente no han estado en contacto con el virus, igualmente sería interesante conocer el riesgo de

desarrollar LMP en aquellos pacientes qPCR+ dobleELISA- para valorar las consecuencias clínicas que dicha situación pudiera implicar.

- Treinta y tres de los 138 pacientes de EM participantes en el estudio fueron negativos a anticuerpos anti-JC y tuvieron una segunda medida de anticuerpos anti-JC y de ADN viral en PBMCs/suero/orina aproximadamente al año de la extracción de la primera muestra. La tasa de seroconversión positiva fue del 36,4% (12/33), mientras que la tasa de conversión positiva de ADN viral en orina fue de un 27,3% (9/23) y la negativa del 12,1%.

Nuestra tasa de seroconversión fue considerablemente superior a la publicada previamente, probablemente debido a que la detección de anticuerpos anti-JC en todas las segundas muestras de sangre se llevó a cabo mediante el doble-ELISA de 2ª generación más sensible que el anterior, quedando constancia de la mejora de dicha técnica. En cualquier caso, en el 25% de los pacientes que seroconvirtieron detectamos el ADN viral en orina en la primera muestras, apuntando a la complementariedad de la qPCR para el doble ELISA. Además, todos los pacientes que tuvieron distintos resultados de conversión entre la primera y la segunda muestra según la técnica empleada, qPCR en orina o doble ELISA, tuvieron una excreción intermitente del virus en orina.

Estos resultados apuntarían a sugerir la inclusión de los niveles de ADN viral en orina medidos por qPCR, en el mismo momento que se analizan los anticuerpos anti-JC por doble ELISA en el algoritmo utilizado hasta el momento para evaluar el riesgo de LMP. Por un lado, se confirmarían los pacientes realmente negativos y por otro lado, al realizarse un seguimiento periódico, se podría especificar el tipo de excreción viral en orina, que como hemos visto con anterioridad, parece ser indicativo de una mayor probabilidad de reactivación del virus JC en suero.

3. Estudio de la posible asociación entre el HLA clase II y la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab

La frecuencia de uno de los alelos del locus *HLA-DRB1*, el *HLA-DRB1*07*, fue significativamente mayor ($p=0,01$, test χ^2) en los pacientes en los que detectamos el virus JC en PBMCs alguna vez durante el tratamiento con natalizumab (53,9%) que en los pacientes en los que no lo detectamos (19,5%), siendo la OR de 4,82.

Es decir, aquellos individuos que posean este alelo probablemente tendrían una respuesta menos eficaz ante la reactivación del virus JC. Esta asociación podría explicarse porque la detección en PBMCs podría ser indicativo, no sólo del estado latente del virus, sino también de su replicación activa en el interior de estas células, sin llegar a la lisis celular o a niveles muy bajos. De cualquier forma, también existe la posibilidad de que este gen esté en desequilibrio de ligamiento con el factor realmente implicado en esta respuesta; por ejemplo, con algún gen del HLA clase I, o con genes que codifiquen para componentes del proteosoma (LMP2 y LMP7), puesto que se encuentran en la región del HLA clase II.

4. Estudio de la posible transactivación del virus JC por HHV-6 durante el tratamiento con natalizumab

El porcentaje de pacientes en los que detectamos el ADN del virus JC alguna vez durante el tratamiento en PBMCs o suero fue parecido entre individuos IgM anti-HHV-

6 positivos y negativos. Ni siquiera en aquellos pacientes positivos a IgM anti-HHV-6 durante todo el tratamiento con el anticuerpo monoclonal se detectó el virus JC.

Todo parece indicar que en nuestra cohorte no existe un fenómeno de transactivación entre ambos virus. Si bien, deberíamos de profundizar más en el tema aumentando nuestra cohorte, e incluso estudiando este fenómeno en el cerebro, pues es aquí, más en concreto en las lesiones de LMP y sus alrededores, donde se ha detectado tanto virus JC como HHV-6.

5. Estudio de las variantes del virus JC en pacientes con LMP

Las secuencias de los 380 clones de las RR del virus JC obtenidas de las muestras de orina de los 3 pacientes coincidieron todas con la de la variante arquetípica. De igual forma, todas las RR analizadas de las muestras de PBMCs y suero de P56 (no LMP con presencia continuada de virus JC en PBMCs y/o suero) fueron arquetípicas. En P1004 (LMP de buen pronóstico a los 2 años con natalizumab) se identificó la variante arquetípica y la neurotrópica (que consistió en una delección de 45 nucleótidos en el fragmento D) en PBMCs, suero y LCR en el momento del diagnóstico de la LMP. En P89 (LMP de peor pronóstico tras 4 años con natalizumab) diferenciamos 5 variantes neurotrópicas en PBMCs, suero y LCR: 3 en el momento del diagnóstico de la LMP, 4 veintidós días más tarde y 4 cuarenta y cinco días tras el diagnóstico (una nueva variante reemplazó a la nueva variante detectada en la visita previa).

En P56 podríamos establecer una asociación directa entre el tratamiento con natalizumab y la reactivación viral, ya que tras la retirada del fármaco no detectamos el virus JC en PBMCs y/suero en este paciente. El hecho de que en P56 detectemos sólo la arquetípica abre la posibilidad de que ésta provenga del riñón. Sin embargo, no parece que la hipótesis arquetípica pudiera tener lugar en nuestros pacientes con LMP, pues ni en P1004 ni en P89 se detectó la variante neurotrópica en orina. Sería más probable que la variante causante de la LMP provenga de células hematopoyéticas movilizadas por el tratamiento con natalizumab; siendo en las PBMCs donde tendrían lugar los fenómenos de reordenamientos pues es en este compartimento donde encontramos mayor número de variantes neurotrópicas. Finalmente, la severidad con la que la LMP se manifestó pareció estar relacionada con el tipo y número de variantes neurotrópicas que presentó cada paciente.

CONCLUSIONES

1. Definimos tres patrones de excreción del virus JC en orina de pacientes tratados con natalizumab: permanente, intermitente y ausente, siendo en el segundo grupo donde la carga viral es significativamente más baja, pero donde apreciamos un incremento estadísticamente significativo de la misma y de la prevalencia a lo largo del tratamiento con natalizumab.

2. Detectamos el virus JC en PBMCs y/o suero alguna vez durante el tratamiento con natalizumab en un 23% de nuestra población, detectándose el ADN viral en suero con mayor frecuencia en los pacientes con una excreción intermitente del virus en orina, frente a los de excreción permanente, posible indicador de la existencia de una respuesta inmune distinta frente al virus entre ambos grupos.

3. La tasa de seroprevalencia de anticuerpos anti-JC (62,3%) y la prevalencia del virus en orina (59,4%) son similares en nuestra población de EM; ninguno de los dos

parámetros parece modificarse en función de las distintas variables clínicas estudiadas, si bien sí se identifica una tendencia al aumento de la seroprevalencia, al igual que de la carga viral en orina, a edades más avanzadas, lo que justificaría el seguimiento de ambos parámetros durante el tratamiento.

4. La concordancia entre los resultados de las dos técnicas estudiadas, qPCR y doble ELISA, es moderada, de tal forma que un 26% de nuestra población habría estado en contacto o no con el virus JC en función de la técnica utilizada. Por ello, consideramos que sería de utilidad evaluar en los pacientes negativos para anticuerpos anti-JC los niveles de ADN de virus JC en orina con qPCR, para asegurarnos del no contacto previo con el virus JC.

5. La tasa de seroconversión positiva de anticuerpos anti-JC es de un 36%, más elevada que la ya publicada.

6. Parece existir cierto componente genético en la respuesta frente al virus JC, de tal forma que los individuos con el alelo *HLA-DRB1*07* posiblemente tendrían un peor pronóstico en caso de LMP, si bien estos resultados deberían ser replicados en cohortes independientes.

7. Nuestros datos no apoyan una posible transactivación del virus JC por parte del HHV-6, ya que los patrones de reactivación de ambos virus durante el tratamiento con natalizumab no están relacionados.

8. Las variantes encontradas en el paciente que no desarrolló LMP son todas arquetípicas, pudiéndose establecer en este paciente en concreto una relación directa entre presencia de virus JC en PBMCs y suero y administración de natalizumab, pues tras la retirada del fármaco no vuelve a observarse presencia del virus en ninguna de las muestras analizadas.

9. En los dos pacientes de EM que desarrollaron LMP detectamos la variante neurotrópica del virus prácticamente de forma simultánea al comienzo de los síntomas clínicos de LMP, pudiéndose establecer una relación entre el pronóstico de la LMP y el número y tipo de variante identificada.

10. En nuestros dos casos de LMP el virus JC parece replicarse activamente en las PBMCs, donde encontramos un mayor número de variantes neurotrópicas que se originarían mediante el reordenamiento de los distintos fragmentos que componen su RR, teniendo lugar primero los fenómenos de delección, y luego los de duplicación.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating inflammatory chronic disease that affects the central nervous system (CNS) and whose origin is probably autoimmune. In developed countries it is the second cause of disability among the youth people, after traffic accidents.

During the last years, a considerable amount of drugs have been developed or currently are in clinical trial phase to treat this pathology. Among them we highlight natalizumab, an antagonist monoclonal antibody of the $\alpha 4$ chain of the dimeric integrin $\alpha 4/\beta 1$, present in all leucocytes except neutrophils. It avoids that cells go through the blood brain barrier to the CNS, in order that the inflammatory processes that are occurring in this organ decrease. This molecule is known for its great clinical efficacy compare to the rest of the marketed treatment; however, its administration has been associated with several cases of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), a devastating demyelinating disease of the CNS caused by the JC virus (JCV).

Until 18 April, 2013 this drug has been administered to more than 100.000 patients and 350 PML cases have been diagnosed. In order to determine the risk of the disease caused by the JCV in the MS patients treated with natalizumab, the pharmaceutical company that distribute this molecule has developed an algorithm that takes into account three factors: presence/absence of anti-JCV antibodies detected by two-step ELISA, time of exposure to natalizumab treatment and previous use of immunosuppressor. So that, those patients who are positive for these anti-JCV antibodies, who have been previously treated with the immunosuppressors and who have been exposed to the drug during more than two years, would have more risk to develop the disease [1 PML:94 MS patients treated with natalizumab (CI: 1:130, 1:70)] than the rest of the groups. PML diagnosis is carried out by magnetic resonance imaging (MRI), presence of clinical symptoms and JCV detection by polymerase chain reaction (PCR) in cerebrospinal fluid (CSF), which is usually present in very low concentrations.

The JCV is a polyomavirus. It does not have envelope and its icosahedral capsid have inside a closed circular, doubled-stranded DNA genome. This genome is organized in 3 parts: an early and late coding regions and a common regulatory region (RR) located between them. This RR contains the origin of replication (ORI) and the union sites of the different transcriptional factors that control the genetic expression of the virus. Moreover, this region determine the viral variant and the cellular tropism of this virus. In this work we distinguish between: 1) the archetype variant: excreted by the urine of a majority of the healthy population, characterized by not being pathogenic and whose sequence is divided in 7 fragments: ORI-A-B-C-D-E-F, 2) the neurotropic variants, related to the PML development and composed by the same fragments than the archetype but rearranged, following a deletion and duplication pattern non-determinate (ej: ORI-A-C-E-A-C-E-F1-F2).

The origin of the neurotropic variant is a subject of a great controversy (maybe from the archetype) apart from the path of the JCV to reach the CNS (if it is not latent there). Two hypotheses have been agreed in the literature. The first one is known as archetype: it claims that the primary infection would be produced by the archetype variant, that could establish latency in the kidneys (occasionally excreted by the urine) and under immunosuppression the different RR fragments could rearrange, acquire neurovirulence

and cause PML when they reach the brain. The second one appeared as opposed to the previous one, following the identification of the neurotropic variant in tissues from the tonsils, gastrointestinal tract, bone marrow, brain,...from non-PML population; thereby, it could be that the neurotropic virus circulate in the healthy human population and also could cause the demyelinating disease during the primary infection. The archetype hypothesis has been widely accepted by the scientific community.

In the case of PML, among MS patients or others immunosuppressed patients, the CD8+ and CD4+ cellular response seem to be critical to control this pathology, contrary to an inefficiently humoral response. Thereby, the patients with VIH associated PML with a antigenospecific CD8+ cells response in which the antigen is presented by class I HLA molecule codified by the allele *HLA-A*0201*, show correlation with a good prognosis of the PML.

Finally, the immunosuppressor effect of this drug, caused by the decrease of T, B and plasmatic cells in the CSF of the treated patients, apart from a disruption of the immunoglobulin synthesis, only seems to affect the pathogenic reactivation of the JCV. Although one could not rule out the possible reactivation of other virus without reaching pathological levels. One of the candidates could be the HHV-6, a recent article associated his reactivation to the natalizumab treatment, moreover, the authors demonstrated in vitro that this virus augmented significantly the JCV replication.

HYPOTHESIS

Several factors could be involved in the PML development in MS patients treated with natalizumab:

- The increase of the JCV reactivation or his viral load during the natalizumab treatment, taking into account the technique used to the viral detection.
- The specific immune response of each patient against the JCV reactivation.
- The existence of a possible transactivation of the JCV by the HHV-6.
- The presence of the neurotropic pathogenic variant throughout the monoclonal antibody treatment.

OBJECTIVES

1. Study of the JCV reactivation in MS patients during the natalizumab treatment using qPCR to detect the viral DNA in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), serum and urine samples.
2. Establishment of the agreement between the results from the two techniques used for the determination of those patients who are or have been infected by the JCV: two-step ELISA and qPCR.
3. Analysis of the possible association between the HLA class II and the JCV presence in PBMCs, serum and urine samples during the natalizumab treatment.
4. Study of the JCV transactivation by the HHV-6 throughout the monoclonal antibody treatment.

5. Determination of the different JCV variants, archetype or neurotropic, present in PBMCs, serum, urine and CSF during the natalizumab treatment in three MS patients, two of whom developed PML.

METHODS

PARTICIPANTS AND STUDY DESINGS

In this work 189 MS patients from the Multiple Sclerosis Unit of the *Hospital Clínico San Carlos de Madrid* were included (2007-2012). In order to achieve the aforementioned objectives, these patients were grouped in several studies developed below, so that certain patients participated in several of them.

1. Study of the JCV reactivation during natalizumab treatment (qPCR): opened cohort study, with 100 MS patients treated with natalizumab in whom we measured the viral DNA levels in PBMCs, serum and urine samples in a first basal visit (BV, without treatment) and after, quarterly until a minimum of 6 months and a maximum of 39. In addition, these viral levels were compared in the BV with those from a cohort of healthy controls.
2. Comparative study of the techniques for the detection of JCV (two-step ELISA vs qPCR): cross-sectional study, with a population of 82 MS patients treated with natalizumab and 55 MS patients non-treated with this drug. We determined in these patients the previous contact with the JCV using two techniques: two-step ELISA/second generation two-step ELISA in serum (anti-JCV antibodies) and qPCR in PBMCs, serum and urine (JCV DNA). Besides, the effect of the following demographic and clinical parameters on the aforementioned laboratory variables was evaluated: sex, age, elapsed time from the MS diagnosis to the extraction of samples for the JCV antibodies measurement and viral DNA detection, previous treatment to natalizumab and length of natalizumab to sample extraction, and number of months treated with the monoclonal antibody.
Twenty-three patients out of the 82 treated with natalizumab and 10 patients out of the non-treated had a second measurement of JCV antibodies (second generation two-step ELISA) one year later of the first extraction, with a simultaneous assessment of the viral DNA (qPCR).
3. Study of the possible association between HLA class II and the JCV reactivation throughout the natalizumab treatment: we proceeded to the typing of *HLA-DRB1* in 9 MS patients with data on JCV reactivation during the treatment with natalizumab.
4. Study of the possible JCV transactivation by the HHV-6 throughout the natalizumab treatment: opened cohort study, we measured the anti-HHV-6 IgG and IgM levels twice a year in 77 MS patients until a minimum of 6 months and a maximum of 24. These patients also participated in the study of the JCV reactivation during natalizumab treatment.
5. Study of the JCV variants in PML patients: cohort study, where 3 MS patients were included: P56 (non-PML but with a JCV reactivation in PBMCs and serum

samples throughout the natalizumab treatment), P1004 (PML after two years with the monoclonal antibody) and P89 (PML after 4 years with the drug). The viral variants detected in PBMCs, serum, urine and CSF samples during the treatment were identified using cloning and sequencing techniques.

TECHNIQUES:

The DNA extraction of PBMCs, serum, CSF and urine samples was made following the QUIAGEN kit instructions. The CSF and serum samples were previously ultracentrifugated. The qPCR primers and probe employed in this work had been previously described. Our detection limit in PBMCs sample was 4 copies/ μ g, in CSF and serum samples 17 copies/ml and in urine 14 copies/ml, after optimized the condition in our laboratory.

The typing of the *HLA-DRB1* locus was performed by the PCR-SSOP technique, and the typing of the main susceptibility allele for the MS, the *DRB1*15:01* allele, was performed by Taqman essay validated previously.

In order to determine the anti-JCV antibodies, a blood sample from the patients of interest was sent to the reference laboratory (Unilabs, Denmark), where the STRATIFY JCV™ (two-step ELISA), or the STRATIFY JCV™ DxSelect™ (two-step ELISA second generation) test is performed.

The anti-HHV-6 IgG and IgM levels were determined by ELISA (Panbio).

In order to identify the different variants present in the samples of P56, P89 and P1004, first the amplification of the JCV RR from these samples was performed, using a previously described nested-PCR. Afterwards, we proceeded to clone these reaction products with the TOPO TA Cloning kit (Invitrogen™) and, finally, to the sequence the obtained clones (1.174 in all). To carry out the analysis of the RR, the sequences were aligned and mapped with the archetype RR with the help of the Mutation Surveyor® V4.0.6. Program.

The statistical analysis was performed using different statistical test, selected on the basis of the study design, and on the characteristic of exposure and response variables: categorical or continuous ones, and parametric or non-parametric ones, using the SPSS statistical package.

RESULTS AND DISCUSSION

1. Study of the JCV reactivation during natalizumab treatment (qPCR)

- The JCV prevalence in PBMCs and serum of healthy controls and MS patients without treatment (BV) was similar, while this prevalence in urine was significantly higher in patients ($p=0.007$, χ^2 test).

The qPCR we worked with had detection limits lower than in previous publication, what could explain that our prevalence in the BV of the MS patients was higher than the previously described in individuals with similar characteristic.

- A significant increase of the JCV prevalence and the viral load in urine was detected throughout the natalizumab treatment, between the BV and the rest from the

V9 (after 9 months of treatment). Furthermore, depending on the type of JCV excretion in urine, we divided our population in 3 groups: permanent (34% of the patients), intermittent (52%) or absent (14%) excretion. The mean viral load of all visits during the treatment in the permanent viral excretion group [6.2 (5.2, 6.9) log copies/ml] was significantly higher than that of the group with intermittent viral excretion in the urine [2.6 (2.2, 3.1) log copies/ml] ($p=8.7 \cdot 10^{-12}$, Mann-Whitney U test). A significant increase of the prevalence and viral load during the treatment was detected in the group with an intermittent viral excretion in urine.

Most previous studies have not detected this increase of the viral prevalence in urine throughout the natalizumab treatment. It is likely due to the higher sensitivity of our qPCR, which allows us to divide our patients' cohort in three groups: 1) with permanent JCV excretion in urine: they had a significant higher viral load compare to the other ones, which did not seem to vary during the natalizumab treatment and whose percentage matched the previous published JCV prevalence; 2) with intermittent JCV excretion in urine: they had a prevalence and viral load that increase throughout the treatment; 3) with a absent JCV excretion.

- In our cohort of MS patients ($n=100$), 23% were sometime positive to the JCV in PBMCs and/or serum samples during the natalizumab treatment. Only 4 patients were simultaneously positive in PBMCs and serum throughout the treatment, of whom two developed PML. We detected a certain tendency to the viral reactivation in serum in those patients with intermittent JCV presence in urine (21.2%) compare to those with a permanent viral excretion (6.1%). It did not happen in PBMCs.

Most published articles have not detected the JCV throughout the natalizumab treatment in PBMCs, nor in serum, what would imply a viral reactivation. It is probably due to that the sensitivity of the used qPCR in this study was higher than the previously published.

The difference of several JCV excretion patterns in urine: intermittent (where it seems to exist a higher probability of JCV detection in serum), permanent and absent, could point out to the existence of immunological and viral differences between them under immunosuppression. It is possible that these differences could later influence at the higher or lower risk of PML.

2. Comparative study of the techniques for the detection of JCV (two-step ELISA vs qPCR)

- In the whole MS population, treated and non-treated with natalizumab, the anti-JCV prevalence was 62.3% and the JCV prevalence in urine was 59.4%. Both parameters did not differ according to sex, age and time since the disease diagnosis. Anti-JCV antibodies were detected in 4 out of the 6 EM patients previously treated with immunosuppressors, and the JCV DNA in one out of these 4 patients.

While the seroprevalence was comparable to that of the previous studies, only slightly higher, the prevalence in urine was significantly higher than in the literature because the detection limit of our qPCR was lower than that used in previous studies. The assessed laboratory variables did not seem to change according to the clinical variables of the study. Not even previous treatment with immunosuppressor and long period of treatment with the monoclonal antibody appeared to be related to high rates of anti-JCV antibodies, probably because the increase of the PML risk with these parameters is not

directly related to a JCV *de novo* infection. There was one exception; we observed an increasing trend in the frequency of anti-JCV antibodies and in the prevalence of the viral DNA in urine with age, beside a non-significant positive correlation between age and viral load. These trends were previously described and could justify the monitoring of these parameters during drug administration.

- The estimation of the agreement degree between the results obtained by the two techniques, two-step ELISA and qPCR, was performed by calculating the Kappa index, which was 0.41 ($p=4.1E*10^{-6}$, Kappa index). We divided our population in 4 groups: qPCR+ two-stepELISA+ (47%), qPCR- two-stepELISA- (27%), qPCR+ two-stepELISA- (12%), qPCR- two-stepELISA+ (14%). The viral load in the urine of the 15 patients (12%) that only were positives with qPCR (2.6 (1.5, 3.5) log₁₀ copies/ml) was significantly lower ($p=0.0002$, Mann-Whitney U test) than the viral load of the 61 positive patients with the two techniques (5 (3.2, 6.6) log₁₀ copies/ml). Regarding the agreement index between the two techniques, 0.4, is considered as moderate. So that, 26% of the population would have been in contact with the virus or not depending on the technique used, similar only to that of some previous papers that used a qPCR with a detection limit similar to ours. Those patients in whom we detected the JCV by qPCR but not using two-step ELISA had a viral load significant lower than patients that were positive with the two techniques. It would be interesting to check if there is any type of agreement between the viral load and the anti-JCV antibody titers. Regarding patients who are negative for anti-JCV antibodies, it would be appropriate to test the levels of viral DNA in urine in order to confirm that they have not truly been in contact with the virus. It would still be interesting to know the risk of developing PML in patients qPCR+ two-stepELISA- to assess the clinical consequences that this situation might imply.

- Thirty three out of the 138 MS patients that participated in the study were negative for anti-JCV antibodies and had a second measure of anti-JCV antibodies and viral DNA in PBMCs/serum/urine at about one year after the extraction of the first sample. The positive seroconversion rate was 36.4% (12/33), while the viral DNA positive conversion rate in urine was 27.3% (9/23) and the negative one 12.1%. Our seroconversion rate was considerably higher than what was previously reported, probably due to the detection of the anti-JCV antibodies in every second blood samples was performed with the second generation two-step ELISA (more sensitive than the previous one), maintaining the constant improvement of this technique. In any case, in 25% of the patients who seroconverted we detected the viral DNA in the first urine sample, pointing to the complementarity of the qPCR for the two-step ELISA. Furthermore, all patients who had different conversion results between the first and the second sample according to the technique, qPCR in urine or two-step ELISA, exhibited intermittent JCV excretion in their urine.

These results would suggest the inclusion of the viral DNA levels in urine measured by qPCR, at the same time that the anti-JCV antibodies are analyzed by two-step ELISA in the algorithm used so far to assess the PML risk. On the one hand, it would confirm patients who are negative; additionally, as we had a regular monitoring, we could specify the type of viral excretion in urine, which as we have observed previously, appears indicative of a greater likelihood of JCV reactivation in serum.

3. Study of the possible association between HLA class II and the JC virus reactivation throughout the natalizumab treatment

The frequency of one of the alleles of the HLA-DRB1 locus, the *HLA-DRB1*07*, was significantly higher ($p=0.01$, χ^2 test) in patients with detectable JCV DNA levels in PBMCs sometime during the natalizumab treatment (53.9%) than in patients with non-detectable viral levels (19.5%), being the OR 4.82.

That is, those individuals who have this allele, likely to have a less effective response against the JCV reactivation. This association could be explained because the viral detection in PBMCs could be indicative, not only of the latent state of the virus but also of his active replication within these cells, without cell lysis or at very low levels. Anyway, it could be possible that this gen was in linkage disequilibrium with the real factor involved in this response; for example, with the HLA class I gen, or with genes coding for components of the proteosoma (LMP2 y LMP7), considering that they are in the HLA class II region.

4. Study of the possible JC virus transactivation by the HHV-6 throughout the natalizumab treatment

The percentage of patients who had detectable JCV DNA levels in PBMCs or serum sometime during the treatment was similar among positive and negative anti-HHV-6 IgM patients. Even in those positive anti-HHV-6 IgM patients, we detected no JCV throughout the monoclonal antibody treatment.

It seems that in our cohort there is no transactivation between the two viruses. Nevertheless, we should go deeper into the issue by increasing our cohort, and even studying this phenomenon in the brain; it is here, more specifically in the lesions of PML and its environs, where it has been detected both JC virus as HHV-6.

5. Study of the JCV variants in PML patients

The sequence of the 380 clones of the JCV RR from the urine samples of the 3 patients matched with the archetype variant. Similarly, all the analyzed RR from the PBMCs and serum samples from the P56 (non-PML with continued presence of the JCV in PBMCs and or serum) were archetype. In P1004 (better prognosis PML at two years with natalizumab) it was identified the archetype and neurotropic (with a 45 nucleotides deletion in the fragment D) variants in PBMCs, serum and CSF at the time of the PML diagnosis. In P89 (worst prognosis PML at 4 years with natalizumab) it was differentiated 5 neurotropic variants in PBMCs, serum and CSF: 3 at time of the PML diagnosis, 4 twenty-two days later and 4 forty-five days after the diagnosis (one new variant replaced the new one detected at the previous visit).

In P56 it could be established a direct association between the natalizumab treatment and the viral reactivation, considering that, after the withdrawal of the drug, the JCV DNA was not detected again in PBMCs and/or serum samples of this patient. The fact that we detected only the archetype variant in P56 opens the possibility that it comes from the kidney. However, it does not seem that the archetype hypothesis may occur in our PML patients, since in P1004 and P89 we did not detect the neurotropic variant in urine. It would be more likely the variant causing the PML to come from the hematopoietic cells mobilized by the natalizumab treatment; being in the PBMCs where the rearrangements could occur, since in this compartment more neurotropic variant was

found. Finally, it seemed to exist a relationship between the PML severity and the number of neurotropic variants present in each patient.

CONCLUSIONS

1. We define three patterns of JCV excretion in the urine of MS patients treated with natalizumab: permanent, intermittent and absent; being in the second group, where the viral load is significantly lower, but where that viral load and the viral prevalence increase significantly throughout the treatment with natalizumab.

2. We detect the JCV in PBMCs and/or serum in 23% of our population sometime during natalizumab treatment, detecting the viral DNA in serum more frequently in patients with intermittent excretion of the virus in urine compare to those with permanent excretion; it could be a sign of the existence of an immune response against the virus different between these two groups.

3 The anti-JCV seroprevalence rate (62.3%) and the prevalence of the JCV in urine (59.4%) are similar in our MS population; none of these two parameters seem to modify according to the different clinical variables studied. However, we observe a trend in which the seroprevalence and the viral load in urine increased at older ages, which would justify the monitoring of both parameters during the treatment.

4. The agreement between the results of the two techniques studied, qPCR and two-step ELISA, is moderate, so that 26% of our population would have been in contact or not with the JC virus depending on the technique used. So that, we consider useful to evaluate the JCV DNA in urine by qPCR in the anti-JCV antibodies negative patients, in order to ensure no previous contact with the JCV.

5. The positive anti-JCV seroconversion rate is 36%, higher than published.

6. There seems to be some genetic component in the immune response to the JCV, so that individuals with the HLA-DRB1*07 allele may have a worse prognosis in cases of PML. But these results should be replicated in independent cohorts.

7. Our data do not support a possible transactivation of JCV by the HHV-6, since the patterns of reactivation of both viruses during natalizumab treatment are not related.

8. The variants found in the non-PML patient are all archetype, and it could be established, in this particular patient, a direct relationship between the JCV presence in PBMCs and serum and the natalizumab administration, since after the drug withdrawal we observed no presence of JCV in any of the samples analyzed.

9. In both MS patients who developed PML we detect the neurotropic variant almost simultaneously at the beginning of the clinical symptoms of PML, being able to establish a relationship between the PML prognosis and number and type of the identified variants.

10. In our two PML cases the JCV seems to replicate actively in the PBMCs, where we find the higher number of neurotropic variants, which would arise for rearrangement of

the various fragments that make up its RR, taking first place the deletion phenomena, and then duplication.

I INTRODUCCIÓN

1. EM

La EM (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica que afecta al sistema nervioso central (SNC), con presencia de daño axonal y cuyo origen es presumiblemente autoinmune. En los países desarrollados, esta patología es la segunda causa de discapacidad entre personas jóvenes después de los accidentes de tráfico, siendo la prevalencia en la población española de unos 90 casos por cada 100.000 habitantes ¹.

1.1 Diagnóstico

En la mayoría de los pacientes las manifestaciones clínicas indican alteraciones en los sistemas motor, sensorial, visual y autónomo, aunque es posible que aparezcan muchas otras ² (tabla 1).

Tabla 1. Síntomas de la esclerosis múltiple según localización afectada (tabla adaptada de Compston y col. ²).

	Symptoms	Signs
Cerebrum	Cognitive impairment	Deficits in attention, reasoning, and executive function (early); dementia (late)
	Hemisensory and motor	Upper motor neuron signs
	Affective (mainly depression)	
	Epilepsy (rare)	
	Focal cortical deficits (rare)	
Optic nerve	Unilateral painful loss of vision	Scotoma, reduced visual acuity, colour vision, and relative afferent pupillary defect
Cerebellum and cerebellar pathways	Tremor	Postural and action tremor, dysarthria
	Clumsiness and poor balance	Limb incoordination and gait ataxia
Brainstem	Diplopia, oscillopsia	Nystagmus, internuclear and other complex ophthalmoplegias
	Vertigo	
	Impaired swallowing	Dysarthria
	Impaired speech and emotional lability	Pseudobulbar palsy
	Paroxysmal symptoms	
Spinal cord	Weakness	Upper motor neuron signs
	Stiffness and painful spasms	Spasticity
	Bladder dysfunction	
	Erectile impotence	
	Constipation	
Other	Pain	
	Fatigue	
	Temperature sensitivity and exercise intolerance	

Sin embargo, en la mayor parte de los casos la evidencia clínica es insuficiente para establecer un diagnóstico claro, y se precisan otras herramientas, como resonancias magnéticas (RM) y bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo (LCR). Así pues, a lo largo del tiempo han ido apareciendo distintos criterios diagnósticos, todos ellos basados en la existencia de criterios de dispersión temporal (2 o más episodios de disfunción neurológica) y de dispersión espacial (síntomas y signos que indiquen la existencia de dos lesiones independientes en el SNC), siendo los más recientes los de Poser³ y los de McDonald⁴. El primero incluye datos clínicos y paraclínicos, y define con exactitud los aspectos que desarrolla, pero tiene la desventaja de haberse establecido con anterioridad a la era de la RM. Los de McDonald valoran la existencia de diseminación en el tiempo y en el espacio de las lesiones mediante RM, sin dejar de lado los episodios clínicos.

A continuación, en la figura 1, se representa una adaptación de los criterios de McDonald. Como podemos apreciar en la imagen, si existen 2 o más brotes (episodios clínicos) con 2 o más síntomas clínicos objetivos no se precisaría ninguna otra prueba adicional (existiría ya diseminación espacial y temporal). Uno de estos episodios clínicos podría sustituirse por una imagen de RM. La diseminación en el tiempo de las lesiones de RM implica: una lesión captante de gadolinio al menos 3 meses después del principio del primer episodio clínico; o una nueva lesión en T2 comparada con un escáner de referencia hecho al menos 30 días después del comienzo de los síntomas clínicos. En el caso de recurrencia de episodios clínicos estereotipados en el mismo emplazamiento neurológico, los criterios para definir diseminación en el espacio mediante imágenes de RM serían que se cumplan 3 características entre: 1) una lesión captante de gadolinio o 9 lesiones nuevas en T2; 2) una o más lesiones infratentoriales; 3) una o más lesiones yuxtacorticales; o 4) tres o más lesiones periventriculares; (una lesión en la médula espinal puede reemplazar alguna de estas lesiones cerebrales). La EM primaria progresiva puede ser diagnosticada tras un año de déficit progresivo y si se cumplen 2 de estas condiciones: 1) una imagen positiva de RM cerebral; 2) una imagen positiva de RM en la médula espinal; y 3) bandas oligoclonales positivas. Todos los pacientes con una presentación clínica apropiada, pero que no reúnan todos los criterios diagnósticos pueden clasificarse como posible EM.

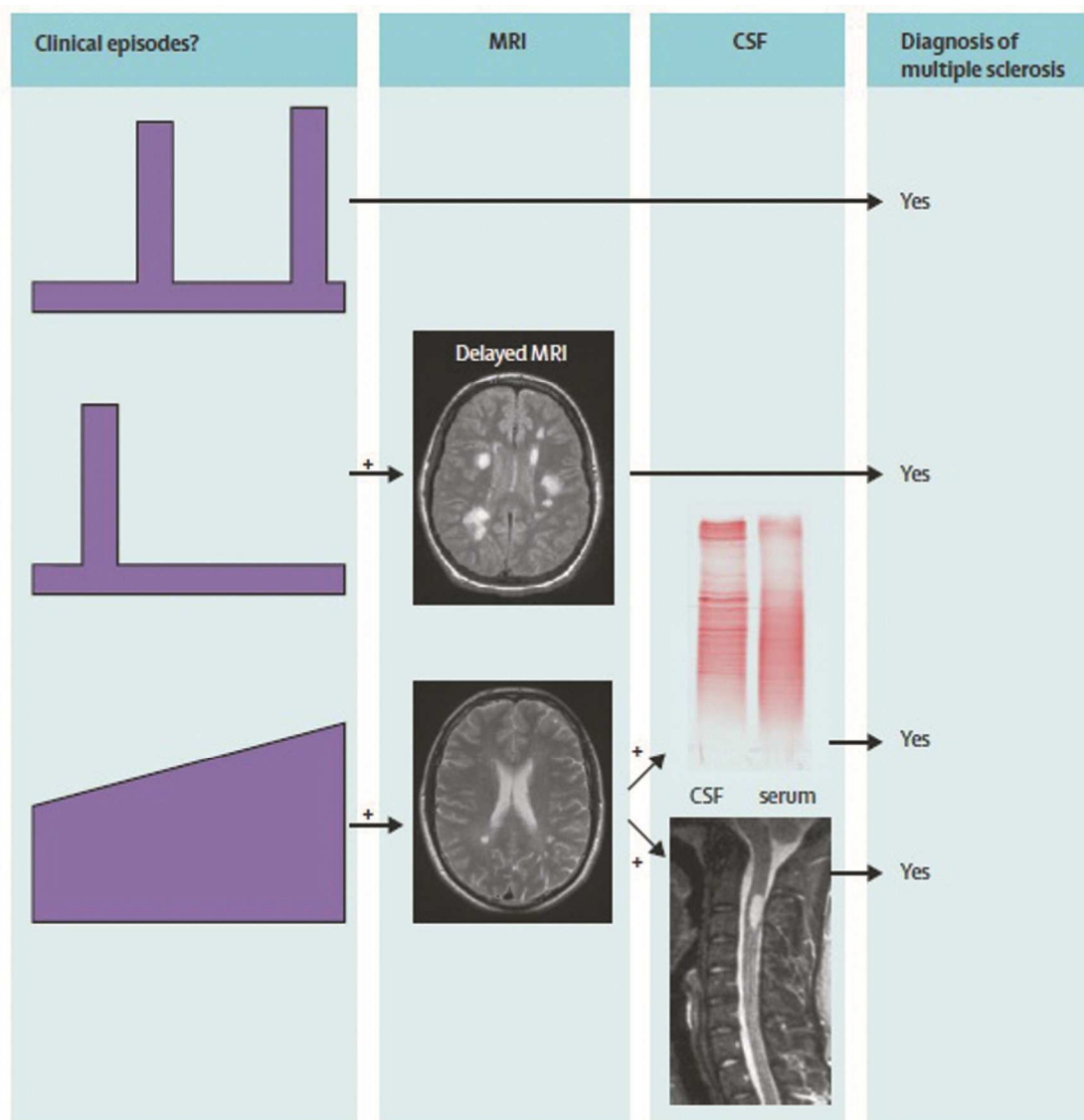


Figura 1. Criterios diagnóstico de esclerosis múltiple (EM) (modificados de McDonald et col. ⁴. MRI:imagen de resonancia magnética; CSF: líquido ceforraquídeo (figura extraída de Compston y col. ²).

1.2 Formas clínicas

El curso de la EM es extremadamente variable, si bien, un 80% de los pacientes comienza con un episodio agudo que afecta a una región del SNC, u ocasionalmente a varias, al cual se le conoce como síndrome clínicamente aislado. Lublin y Reingold ⁵ definieron 4 patrones temporales:

- EM recurrente-remitente (EMRR)

En la mayoría de los pacientes (80-85%) la enfermedad, inicialmente, sigue un patrón recurrente de ataques agudos (brotes episódicos) con recuperación y fase estable entre ellos. Los brotes clínicos implican que la enfermedad está activa, pero las remisiones

clínicas no significan que ésta esté quiescente. La RM ha mostrado que aunque la patología esté en periodo de remisión sigue progresando.

- EM secundariamente progresiva (EMSP)

Consiste en el deterioro neurológico gradual con o sin superimposición de brotes agudos en un paciente que previamente presentaba EMRR. Alrededor del 50%-60% de los pacientes con EMRR desarrollarán la EMSP.

- EM primariamente progresiva (EMPP)

Comprende a aquellos pacientes (10-15%) que sufren un deterioro continuo y gradual desde el comienzo de los síntomas sin experimentar ataque agudo alguno. Ciertos pacientes con EMPP comienzan la enfermedad a mediana edad, y los hallazgos en RM y en LCR son exactamente idénticos a los encontrados en EMSP. Estos pacientes probablemente presentan una EMSP, pero sin brotes clínicos evidentes durante las etapas tempranas de la enfermedad. Otras EMPP parecen tener un proceso degenerativo con mínimas evidencias de inflamación. Estos pacientes se suelen presentar con un trastorno del movimiento que empeora gradualmente y a menudo tienen poca enfermedad cerebral (entendida como aquella que se aprecia por RM).

- EM progresiva-recurrente

Deterioro neurológico gradual desde el principio, pero con brotes subsiguientes superimpuestos. Este es un patrón clínico inusual que puede ser también análogo a la EMSP sin un comienzo recurrente-remitente inicial.

1.3 Valoración clínica del paciente

La escala más utilizada tradicionalmente para valorar la discapacidad del paciente es el la *Expanded Disability Status Scale (EDSS)* ⁶. Ésta es una escala ordinal que comprende 19 pasos entre el 0 y el 10, en incrementos de 0,5. El incremento en la puntuación representa un aumento de la discapacidad. Entre 0 y 3,5 la puntuación obtenida se basa en las puntuaciones asignadas a ocho sistemas funcionales. Entre 4,0 y 5,5, la puntuación representa la distancia que el paciente puede caminar; 6,0 la necesidad de asistencia unilateral para caminar, como un bastón; 6,5 la necesidad de asistencia bilateral, como un andador. Puntuaciones de 7,0 a 9,5 indican incrementos en el grado de inmovilidad y dependencia.

También mencionar la existencia de la *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC), una escala relativamente reciente desarrollada por la *National Multiple Sclerosis Society Clinical Outcomes Assessment Task Force* ⁷ en respuesta a las carencias de la anterior. Esta escala incluye, además de la valoración de la deambulación y de los miembros superiores, un test cognitivo. Su empleo en la práctica clínica diaria no está aún establecido, pero sí es una escala que se está utilizando en la actualidad de forma rutinaria para la valoración de la discapacidad en los ensayos clínicos.

Otro parámetro clínico que se estudia en estos enfermos de EM es la presencia de brotes. Estos consisten en la aparición de nuevos síntomas neurológicos o reaparición de síntomas previos, al menos 30 días después del inicio del episodio de recidiva precedente, que persiste más de 24 horas y que se produce en ausencia de fiebre o proceso infeccioso conocido. Debe de poder ser objetivado en la exploración neurológica, de modo que exista un incremento en la puntuación de cualquiera de las escalas (Sistemas funcionales y/o EDSS) con respecto a las mediciones inmediatamente anteriores. No podrá ser considerado brote la fatiga, la disfunción sexual o la disfunción esfinteriana aisladas.

1.4 Epidemiología de la EM

Aunque la mayoría de los pacientes de EM desarrollan los síntomas iniciales durante la juventud o mediana edad, la enfermedad se puede manifestar virtualmente a cualquier edad. Antes de los 15 y después de los 60 los casos son raros, debutando la mayoría de los pacientes entre los 25 y los 30 años de edad. Las mujeres están afectadas más frecuentemente que los hombres con ratios que varían entre 2:1 y 3:1, dependiendo de las series, igualándose esta proporción entre sexos en la forma PP ⁸.

En términos generales, se considera que la distribución de la EM aumenta con la distancia norte o sur al ecuador (figura 2). Sin embargo, hay excepciones a esta asunción, existiendo regiones con frecuencias desproporcionadamente altas o bajas de la enfermedad y, modificaciones de la prevalencia en función de las migraciones en edades tempranas entre regiones de alto y bajo riesgo, como veremos más adelante ².

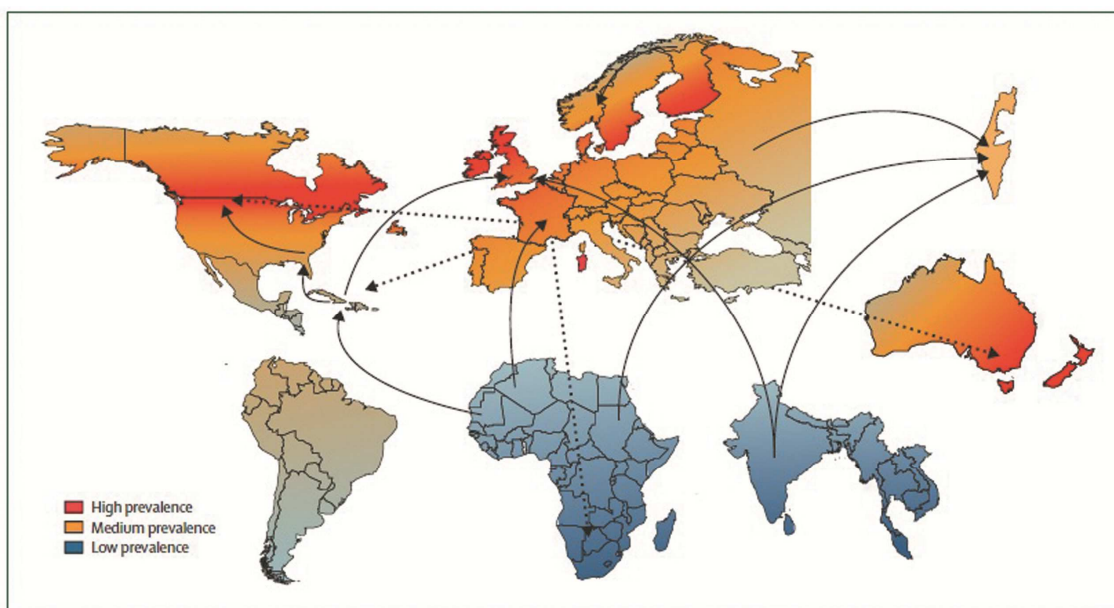


Figura 2. Distribución geográfica de la esclerosis múltiple (EM). Se representan los 5 continentes donde se muestran las áreas de prevalencia media de la EM (naranja), las de excepcionalmente alta frecuencia (rojo) y aquellas con tasas bajas (gris-azul). Algunas regiones no han sido realmente exploradas, estos colores sólo pretenden proporcionar una idea de las tendencias de la distribución geográfica. La mayoría de las rutas migratorias desde zonas de alto riesgo del norte de Europa se muestran con flechas discontinuas. Los estudios que implican migraciones desde zonas de bajo riesgo a zonas de alto riesgo se muestran como flechas continuas (figura extraída de Compston y col. ²).

1.5 Etiología

La hipótesis patogénica más aceptada en la actualidad es que la EM se desarrolla en sujetos genéticamente predispuestos, sobre los que incide un factor ambiental desconocido que pone en marcha un proceso inmune anormal, que sería el causante de la inflamación presente en las lesiones características de esta enfermedad. Cual de estos dos factores, genético u ambiental, tiene más peso en la enfermedad es un tema que carece de sentido discutir, pues ambos se complementarían.

1.5.1 FACTORES GENÉTICOS

La idea de la existencia de un componente genético en la EM se sustenta en varios pilares. Por un lado, se ha descrito que existe una incidencia diferente de la enfermedad en función del origen étnico ^{9,10}; hay etnias con una cierta resistencia a la enfermedad: samis en Noruega, inuitas en Canadá, huteritas en Norteamérica, oriundos de las repúblicas de Asia central (Kazajistán, Uzbekistán, Kirguistán y Turkmenistán), gitanos

de Europa central, negros africanos, amerindios de Sudamérica y Norteamérica y maoríes ¹¹, mientras que otros parecen tener una mayor susceptibilidad; en Cerdeña, por ejemplo, se ha descrito una elevada incidencia y prevalencia de la EM ¹².

Además, la EM tiene una tasa de recurrencia familiar alrededor del 20%. Globalmente, el riesgo varía de un 3% en familiares directos (hermanos 5%, padres 2% e hijos 2%) a un 1% en familiares de primer y segundo grado de consanguineidad. Confiendo un riesgo relativo del 9,2 3,4 y 2,9, respectivamente, comparado con el riesgo ajustado por edad de la población blanca del norte de Europa de un 0,3% ¹³.

Con respecto a estudios de EM realizados en gemelos, se obtienen resultados contradictorios: en poblaciones de Canadá y Reino Unido la tasa de concordancia clínica es mayor en monocigóticos que en mellizos dicigóticos (25% vs 5%) ^{14,15}; mientras que en estudios realizados en Francia e Italia las tasas presentadas por ambos grupos son similares ¹⁶.

Así pues, se considera la EM como una enfermedad genética compleja con una modesta heredabilidad; es decir, aunque tiene un componente genético importante, éste no se hereda según un patrón simple de transmisión mendeliana. La susceptibilidad global viene determinada por interacciones complejas de variantes alélicas de un gran número de genes, cada uno de los cuales produce sólo una pequeña contribución al riesgo global de la enfermedad, y de éstos con el medio ambiente.

La única región genética asociada sistemáticamente a la EM ha sido el complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC) o también conocido como el antígeno de histocompatibilidad humano (*human leukocyte antigen*, HLA) en el caso de humanos, que proporciona entre un 15 y un 60% de toda la susceptibilidad genética en la EM ^{17,18}.

Esta región génica está ubicada en el cromosoma 6, en el locus 6p21.3 y se caracteriza por su alta densidad genética, baja tasa de recombinación (elevado desequilibrio de ligamiento entre segmentos del MHC), alta variedad genética y expresión codominante. Además, ha sido asociada a otras enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo I, enfermedad celiaca y espondilosis anquilosante ¹⁹.

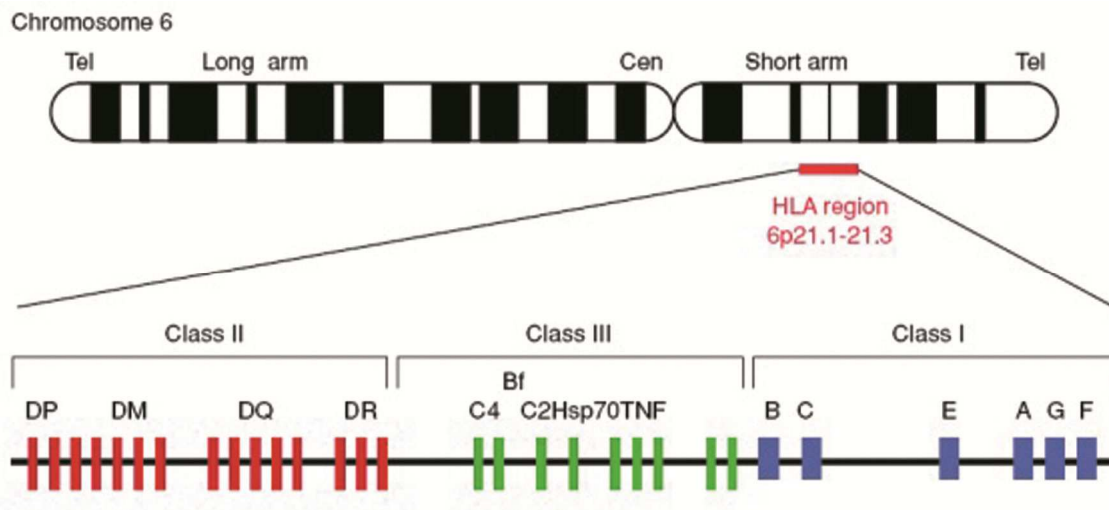


Figura 3. Mapa génico de la región del HLA (human leukocyte antigen). C2, C4: proteínas del complemento; Cen: centrómero; Hsp: las proteínas de choque térmico; Tel: telómero; TNF: factor de necrosis tumoral (figura extraída de Traherne y col.²⁰).

Como vemos en la imagen (figura 3) se dividen en 3 subregiones: clase II, clase III y clase I en función de su localización, de la más centromérica a la más telomérica respectivamente. La subregión de clase I (en la que se encuentran entre otros los genes *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*) y la de clase II (en la que cabe destacar los loci *HLA-DP*, *HLA-DR* y *HLA-DQ*) codifican para glicoproteínas altamente polimórficas de la superficie celular que intervienen en la presentación de antígeno a los linfocitos T. En concreto, las moléculas del HLA clase I presentan antígeno a los linfocitos T CD8+ citotóxicos y median la respuesta inmune frente a antígenos “endógenos” (dianas infectadas por virus), mientras que las moléculas de HLA II están implicadas en la presentación de antígenos “exógenos” a los linfocitos T CD4+. La región del HLA clase III contiene muchos genes que codifican proteínas que no están relacionadas con la inmunidad celular, pero que sin embargo modulan o regulan la respuesta inmune de otras formas: mediante el factor de necrosis tumoral (TNF), las proteínas de choque térmico (Hsps) o proteínas del complemento (C3, C4)^{20,21}.

Concretando un poco más, las moléculas de clase I consisten en dos cadenas polipeptídicas: la cadena α (codificada por los genes *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*), y otra cadena más pequeña asociada a ésta de forma no covalente, la β_2 -microglobulina (no codificada por las moléculas de MHC). Las moléculas de MHC clase II consisten en un complejo no covalente formado por dos cadenas: α y β (codificadas por 3 pares de genes: *HLA-DR*, *HLA-DP* y *HLA-DQ*).

De entre los 421 genes existentes en la región del HLA, de los cuales se expresan 60%, varios de ellos se han asociado a la susceptibilidad a padecer EM, principalmente los de clase II. Mediante técnicas de biología molecular se ha podido concretar que el subtipo del alelo *HLA-DR2* que confiere susceptibilidad a EM es el *HLA-DRB1*1501*, principal factor genético asociado a al EM ²² a su vez, el haplotipo *HLA-DRB5*0101-HLA-DRB1*1501-HLA-DQA1*0102-HLA-DQB1*0602* contiene aproximadamente el 50% del riesgo genético de padecer EM ²³. Sin embargo, recientemente se ha comparado la presencia de 13 genes candidatos (previamente identificados en los estudios de genoma completo) en familias multiplex y casos esporádicos, y se ha concluido que la concentración de alelos de susceptibilidad en los genes de *IL2RA* (cadena alfa del receptor de interleucina 2), *IL7R* (cadena alfa del receptor de interleucina 7), *EVI5* (proteína que regula la estabilidad y acúmulo de factores críticos en la fase G1 del ciclo celular), *KIAA0350* y *CD58* (molécula coestimuladora y de adhesión LFA-3) es parcialmente responsable del aumento de prevalencia de la EM en las familias múltiples ²⁴.

1.5.2. FACTORES AMBIENTALES

Entre las evidencias que apuntan a la implicación de factores ambientales en la etiología de la EM encontraríamos, como hemos visto en el apartado anterior de epidemiología, la variabilidad de la distribución de la prevalencia de la EM en el mundo en función de la latitud. Además, la EM es más común en regiones pobladas por europeos del norte, aunque la distribución varía en función de donde estos individuos transcurran las primeras etapas de vida. También, los movimientos migratorios que implican un elevado número de personas afectan a la distribución de la EM. Así, estudios en África del Sur ²⁵, Israel ²⁶, Hawái ²⁷ y de inmigrantes a Reino Unido ²⁸ correlacionan el riesgo de EM con el lugar de residencia durante la infancia. La migración desde zonas de alto a bajo riesgo en la infancia se asocia con una reducción del riesgo, mientras que de bajo a alto riesgo parece aumentar el riesgo de padecer EM comparándolo con la población de origen ² (figura 2).

De este modo, los estudios epidemiológicos descritos en este apartado apuntan al posible papel de un agente infeccioso en la etiopatogénesis de la EM; junto con otros trabajos que reportan que los pacientes de EM fueron infectados con los virus del

sarampión, rubeola, paperas y el virus Epstein-Barr en edades más tardías que la población control pareadas por HLA-DR2 ^{29,30}.

Estos datos apoyarían la llamada hipótesis de la higiene, por la cual, aquellos individuos expuestos a agentes infecciosos durante los primeros años de vida, debido a un ambiente no tan “limpio”, parecen estar más protegidos frente a la enfermedad (tal vez mediante el desarrollo de respuestas inmunes efectivas) que aquellos expuestos a estos mismo agentes infecciosos durante la juventud ³¹. Son muchos los virus que se han relacionado en algún momento con el desarrollo de la EM, si bien, el virus del Epstein-Barr (EBV) y el herpesvirus humano 6 (HHV-6), pertenecientes a la familia *Herpesviridae* junto con los retrovirus endógenos humanos (HERV) son los que acumulan más evidencias de su implicación en la patogenia de la enfermedad.

Globalmente, los herpesvirus humanos (HHV-6, EBV) presentan una serie de características que hace que tengan un especial interés en el contexto de la patogenia de la EM: 1) después de una infección primaria durante la infancia o la adolescencia, las infecciones presentan cursos de latencia-reactivación similares al carácter remitente-recurrente de la EM; 2) la mayoría causan infecciones persistentes en el SNC, al menos en forma de ADN ³² 3) algunos son transportados axonalmente en el interior de las neuronas ³³ y 4) otros pueden inducir desmielinización en el SNC ³⁴.

Con respecto a la implicaciones del HHV-6 en la EM las aproximaciones han sido muy variadas e incluyen: estudios serológicos en los que se han detectado niveles superiores de IgM frente al virus en el suero y LCR, lo que indica que existe una infección persistente o una reactivación ³⁵; estudios moleculares por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han detectado una mayor presencia de ADN del virus en muestras de sangre y suero de pacientes que en controles; estudios de RM que relacionan la evolución de las imágenes obtenidas por captación de gadolinio con la evolución de la infección por HHV-6 ³⁶; estudios de mimetismo molecular entre la secuencia del HHV-6 y la de la proteína básica de la mielina ³⁷; aislamiento del virus directamente de las placas de desmielinización a partir de biopsias de tejido cerebral ³⁸; estudios en los que se ha visto una mayor respuesta linfoproliferativa, así como una mayor frecuencia de precursores de células T frente a la variante A del virus en pacientes con EM que en controles, lo que indica una respuesta inmune específica ³⁹. También se ha sugerido que el HHV-6 podría estar implicado directamente en la patogenia de la EM a través de la infección directa de los oligodendrocitos y se ha

encontrado asociación temporal entre la infección por HHV-6A y la aparición de los primeros síntomas clínicos en algunos pacientes con EM ⁴⁰.

Finalmente, también se han encontrado interacciones entre la presencia de infección activa por HHV-6 y ciertos genes en pacientes con EM. Así, Martínez y col. ⁴¹ encontraron en pacientes de EM una fuerte asociación del alelo minoritario C (rs4,774G/C) del gen MHCIIA (que codifica para un factor de transcripción utilizado como diana en las estrategias inmunoevasivas de algunos herpesvirus) con el grupo donde se detectó el HHV-6A, frente a la detectada con el grupo negativo para HHV-6A o el de controles sanos.

Por último, hacer referencia a los factores de riesgo no infecciosos más relevantes, como el efecto protector de la vitamina D frente a la EM ⁴² o el tabaquismo como posible factor de riesgo que aumentaría la susceptibilidad a la enfermedad ⁴³.

1.6 Patología de la EM

De forma resumida, el proceso patológico de la EM consiste, fundamentalmente, en un desorden inflamatorio de carácter autoinmune del cerebro y la médula espinal, en el que la infiltración de linfocitos locales conduce a daño en la mielina y en los axones. Inicialmente la inflamación es transitoria y tiene lugar un proceso de remielinización, pero no es duradero. Así, en la forma clínica EMRR las primeras etapas de la enfermedad se caracterizan por episodios de disfunción neurológica de los cuales el paciente normalmente se recupera. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, los cambios patológicos provocan una activación de la microglía generalizada que se relaciona con la neurodegeneración crónica y extensiva. La correlación clínica de esto sería la acumulación progresiva e irreversible de la discapacidad ².

En la figura 4 se muestra de forma esquemática como el proceso de inflamación, desmielinización y degeneración axonal explicaría el curso clínico de la EM. La actividad inflamatoria del SNC suele preceder a la aparición de los síntomas clínicos por muchos años, de tal forma que las imágenes de RM han mostrado que, por cada episodio clínico, hay aproximadamente 10 nuevas placas; este principio se representa en la figura con un umbral clínico hipotético, por debajo del cual los efectos de las lesiones inflamatorias individuales pueden ser compensadas y por encima del cual causarían los síntomas clínicos. A nivel patológico, el primer evento es una inflamación dirigida por

linfocito (A). Esta inflamación podría impedir la conducción saltatoria del potencial de acción (puntas de flecha) de tres modos: los mediadores inflamatorios solubles podrían producir bloqueo de la conducción en axones estructuralmente intactos (A); o podría haber desmielinización (B) o transección (C). La microglía estaría activada y contribuiría al proceso de inflamación y al de reparación mediante la retirada de los restos de la mielina y la promoción de la remielinización (F). Si esto falla, constantemente los axones desmielinizados se podrían adaptar mediante la redistribución de los canales iónicos (E) lo cual resultaría inadaptado y promovería la neurodegeneración crónica (G). La microglía puede convertirse en crónicamente activada en ausencia de inflamación linfocítica, en áreas de apariencia normal de la sustancia blanca y también conducir a la pérdida neuronal en los últimos estadios de la enfermedad (D). En respuesta al daño crónico en tejido, los astrocitos causan gliosis, que puede actuar como una barrera mecánica para la reparación (H). En la figura 4 no se representa la EM primariamente progresiva, en la cual existe una degeneración axonal significativa precedida o no por una fase inflamatoria previa.

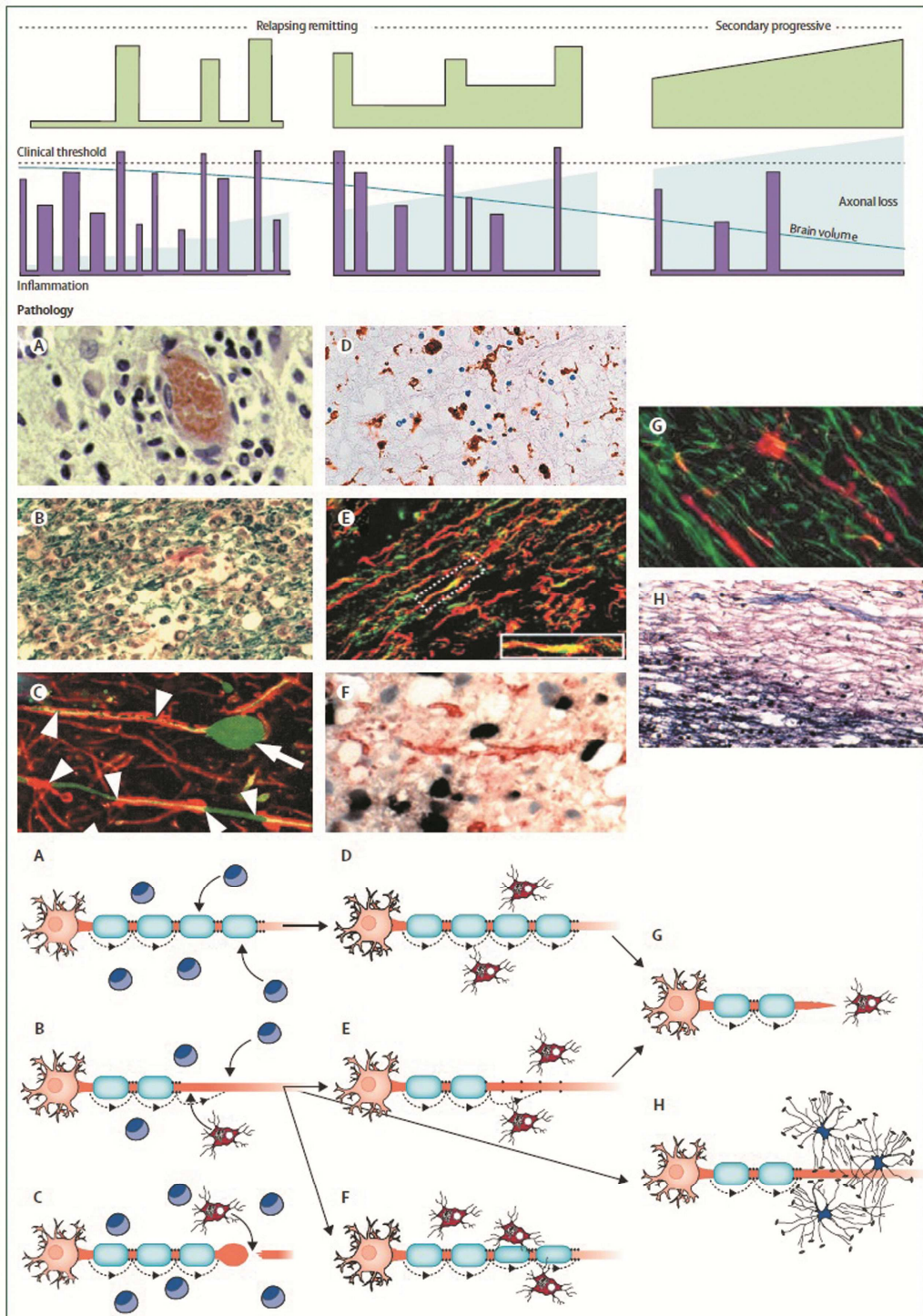


Figura 4. Curso y patogénesis de la esclerosis múltiple (EM). Las flechas indican la progresión de la patología. A: tinción con hematoxilina y eosina; B: tinción de mielina con azul luxol rápido mostrando lesiones muy tempranas con varios macrófagos cargados con mielina y algunos nervios mielinizados intactos; C: neurofilamentos no fosforilados (tinción SMI32) marcan terminales de axón esferoides; D: microglía CD68+; E: redistribución de los canales de sodio a lo largo de los axones desnudos, anti canales de sodio (verde), antineurofilamentos (rojo); F: oligodendrocito con ARNm de proteína proteolípídica (negro) conectado al axón remielinizado con inmunoreactividad frente a la proteína proteolípídica (rojo); G: confocal de una placa sombra, con un oligodendrocito remielinizando (anticuerpos frente a proteína proteolípídica en rojo) y axones no mielinizados degenerando (anticuerpos anti-neurofilamento en verde); H: tinción con hematoxilina y eosina (figura extraída de Compston y col. ²).

2. TRATAMIENTOS PARA LA EM

2.1 Introducción

Durante la mayor parte del siglo XX el tratamiento de los pacientes con EM se dirigió principalmente a controlar los síntomas asociados, es decir al uso de corticosteroides durante los brotes. Durante la segunda parte del siglo se vivió una búsqueda acelerada de terapias inmunomoduladoras e inmunosupresoras. Aunque los estudios clínicos con agentes inmunosupresores empezaron en los 70 y continuaron durante los 90, siendo la mitoxantrona el de uso más extendido, el interés pronto se desvió hacia los agentes inmunomoduladores, particularmente los interferones (IFNs) y el acetato de glatiramero.

Los IFNs son una familia de citoquinas que poseen propiedades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. Fue su actividad antiviral lo que llevó al estudio del uso terapéutico del IFN en la EM, aunque más tarde el interés se dirigió hacia sus características inmunomoduladoras. Entre los IFNs que se están administrando en la actualidad a estos enfermos tenemos el IFN-beta 1-b (Betaferon®), y el IFN-beta-1-a. El primero es un producto recombinante, no glicosilado, derivado de *Escherichia coli*, que difiere del IFN-beta natural por la sustitución de un único aminoácido, se administra 250 µg cada 48 horas por vía subcutánea. Mientras que el segundo, el IFN-beta-1-a, es un producto recombinante, glicosilado y producido en mamíferos, que está disponible en tres preparaciones diferentes: Rebif® (22 µg o 44 µg tres veces a la semana por vía subcutánea) y Avonex® (30 µg una vez a la semana por vía intramuscular). Todos ellos han demostrado que tienen un efecto similar: disminuyen la actividad de la enfermedad en imágenes de RM, reducen entre un 30-35% la tasa de brotes, tienen un impacto marginal, aunque significativo en la progresión de la enfermedad a corto plazo y han demostrado que retrasan la transición de síndrome clínicamente aislado a EM ⁴⁴.

El acetato de glatiramero es un copolímero sintético de aminoácidos análogo de la proteína básica de la mielina; se cree que modula las vías inmunitarias implicadas en la patogénesis de la EM y estimula la secreción de neurotropinas en el SNC, promoviendo

así la reparación neuronal. Se inyecta 20 mg cada 24 horas de forma subcutánea. Posee un buen perfil de eficacia y seguridad descrito en numerosos ensayos clínicos ⁴⁵.

En las últimas décadas, el mayor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad ha permitido desarrollar nuevas terapias. Con estas nuevas terapias en desarrollo se pretende una mejora de la eficacia clínica comparadas con las ya existentes, tanto en reducción del número de brotes y de la progresión de la discapacidad, como en lo que se refiere a tolerabilidad y cómo no, a una mejora de la vía de administración. Así pues, están apareciendo una nueva generación de fármacos orales, frente a los inyectables ya existentes, entre los que cabría destacar el fingolimod, la teriflunomida, el laquinimod y el dimetil-fumarato (BG12).

Por último, la principal alternativa a estas terapias orales frente a la EM serían los anticuerpos monoclonales, que combinan una elevada potencia biológica con una selectividad de acción. En la tabla que se presenta a continuación podemos observar las terapias con anticuerpos monoclonales actualmente en desarrollo ⁴⁴.

Tabla 2. Terapias con anticuerpos monoclonales en desarrollo para la esclerosis múltiple (EM) (tabla extraída de Fontura ⁴⁴).

Name	mAb type	Target	Mechanism		Company	Development phase
Natalizumab	IgG4κ	Alpha4 integrin	Blocking lymphocyte migration CNS		Biogen Idec Elan	FDA/EMA approved
Studies	Clinicaltrials.gov identifier	Patient numbers	MS type	Comparator	Duration	Benefit/Risk
AFFIRM	NCT00027300	942	RMS	Placebo	2 years	Clear reduction ARR, disease-free status and MRI activity
SENTINEL	NCT00030966	1171	RMS	NAT + IFNβ1a i.m. NAT + placebo	2 years	Hypersensitivity reactions 2 PML cases detected
Daclizumab	IgG1	Alpha-chain CD25	Blocking IL-2 binding to T cells Expansion NK CD56 ^{high} regulatory cells		Biogen Idec Facet Biotech	Phase 2 ongoing Phase 3 started
Studies	Clinicaltrials.gov identifier	Patient numbers	MS type	Comparator	Duration	Benefit/Risk
CHOICE	NCT00109161	230	RMS	DAC + IFNβ1a Placebo + IFNβ1a	6 months	Reduction in MRI activity
SELECT	NCT00390221	600 pln	RMS	Placebo	12 months	Slight increase in infection rates
DECIDE	NCT01064401	1500 pln	RMS	IFNβ1a i.m.	2–3 years	
Alemtuzumab	IgG1κ	CD52	Immune cell depletion Post-reconstitution increase in regulatory T cell population		Genzyme Bayer-Schering	Phase 2 completed Phase 3 planning
Studies	Clinicaltrials.gov identifier	Patient numbers	MS type	Comparator	Duration	Benefit/Risk
CAMMS223	NCT00050778	344	RMS*	IFNβ1a s.c.	2 years	Very significant reduction in ARR and MRI activity. Reversal in EDSS progression
CARE MS I	NCT00530348	581 pln	RMS*	IFNβ1a s.c.	2 years	Trial prematurely stopped: 6 cases of ITP (1 fatal), thyroid disease
CARE MS II	NCT00548405	840 pln	RMS	IFNβ1a s.c.	2 years	
Rituximab	IgG1κ	CD20	B cell depletion Downstream effects on immune system		Genentech	Phase 2 completed
Studies	Clinicaltrials.gov identifier	Patient numbers	MS type	Comparator	Duration	Benefit/Risk
HERMES	NCT00097188	104	RMS	Placebo	48 weeks	Very significant reduction in MRI activity, reduction in ARR
OLYMPUS	NCT00087529	439	PPMS	Placebo	96 weeks	Trend for reduction in EDSS; subgroup analysis positive in younger patients with active MRI
						No significant safety issues in MS trials; PML cases have been reported in cancer and rheumatological diseases with RTX
Ocrelizumab	IgG1κ	CD20	B cell depletion Downstream effects on immune system		Roche Genentech	Phase 2 ongoing
Studies	Clinicaltrials.gov identifier	Patient numbers	MS type	Comparator	Duration	Benefit/Risk
Phase 2	NCT00676715	250 pln	RMS	Placebo IFNβ1a i.m.	96 weeks	Results pending

*RMS (*early active RMS*): EMRR activa precozmente, comienzo de la enfermedad <5 años, >2 brotes en los dos últimos años, EDSS 0–3; ARR (*annualized relapse rate*): tasa de brotes anual; DAC: daclizumab; EDSS (*Expanded Disability Status Scale*): Escala expandida del estado de discapacidad; EMA (*European Medicines Agency*): agencia europea del medicamento; FDA (*United States Food and Drug Administration*): Agencia de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos; IFN: interferón; i.m.: intramuscular; MRI (*magnetic resonance imaging*): imagen de resonancia magnética; MS (*multiple sclerosis*): esclerosis múltiple; NAT: natalizumab; PPM (*primary progressive MS*): EM primariamente progresiva; Pln (*planned*): planificado; RMS (*relapsing MS*): EM recurrente remitente (EMRR); RTX, rituximab; s.c. (*subcutaneous*): subcutáneo; PML (*progressive multifocal leukoencephalopathy*): leucoencefalopatía multifocal progresiva; ITP (*immune thrombocytopenic purpura*): púrpura trombocitopénica inmune.

2.2 Natalizumab

2.2.1 INTRODUCCIÓN

Natalizumab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado en Europa y en EEUU para el tratamiento de la EMRR. Actualmente está indicado para los casos más activos de dicha forma clínica, y ante fracaso terapéutico de los fármacos de primera línea, como IFNs y acetato de glatiramero.

Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG4) antagonista de la cadena $\alpha 4$ de la integrina dimérica $\alpha 4/\beta 1$ también conocida como VLA-4 (*very late activation antigen 4*) y de la $\alpha 4/\beta 7$. La VLA-4 se expresa en todos los leucocitos excepto en neutrófilos, y al bloquearla se impediría la unión a su ligando, las moléculas de adhesión celular de los vasos sanguíneos (VCAM-1) que están sobreexpresadas en el endotelio durante la inflamación. Es decir, se inhibiría la extravasación de leucocitos, principalmente linfocitos, desde el torrente circulatorio al tejido diana, más específicamente al SNC ⁴⁶.

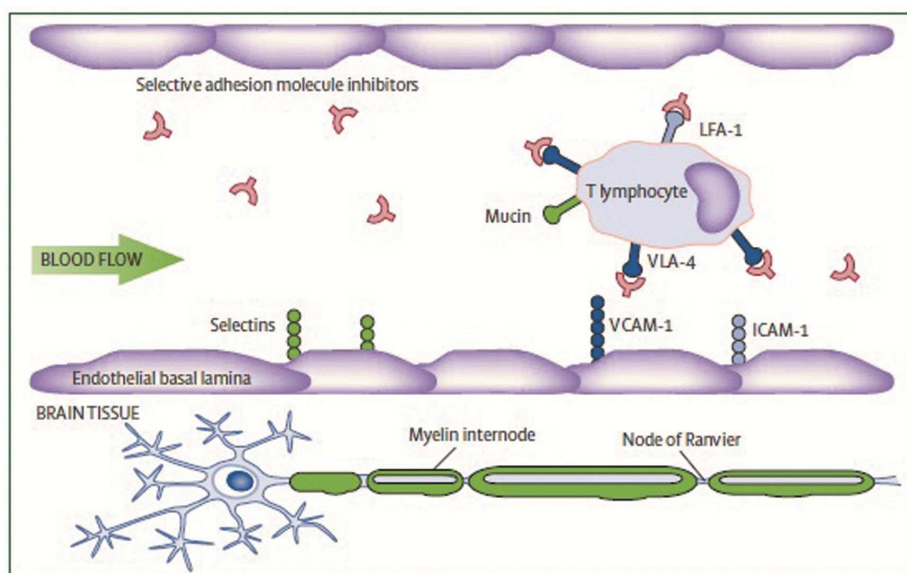


Figura 5. Inhibición del tráfico de linfocitos por el tratamiento con natalizumab. Natalizumab es un inhibidor de moléculas de adhesión selectivo, impide la unión de los linfocitos T a las células endoteliales al inhibir la interacción de la integrina VLA-4 (*very late antigen 4*) con su receptor, la molécula de adhesión celular de los vasos sanguíneos (VCAM-1). La adhesión de los linfocitos T a las células endoteliales representa el primer paso del proceso de trans migración a través de la lámina basal endotelial (barrera sangre-cerebro) y al sistema nervioso central (imagen extraída de Carson y col. ⁴⁷).

El primer trabajo publicado sobre cómo el bloqueo de las cadenas $\alpha 4$ no permitían la unión de leucocitos a los vasos inflamados del SNC fue realizado por Yednock y col., donde se consiguió inhibir la encefalomielitis autoinmune experimental en ratón ⁴⁸. Estos resultados se trasladaron rápidamente a la clínica y en el 2004 la Agencia de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) aprobó el tratamiento con natalizumab para pacientes con EMRR.

En el ensayo aleatorizado AFFIRM a 942 pacientes de EMRR se les suministró 300 mg de natalizumab o de placebo cada cuatro semanas durante dos años. Los pacientes que recibieron natalizumab redujeron en un 68% su tasa de brotes en el primer año y la progresión de la discapacidad en dos años disminuyó en un 42%. En lo que respecta a las lesiones de RM, el tratamiento con natalizumab las redujo en un 92%.

En un segundo ensayo fase III (SENTINEL) se le suministra a 1.171 pacientes tratados ya con IFN-beta-1a que habían padecido al menos un brote durante el año anterior 300 mg de natalizumab o de placebo cada cuatro semanas durante dos años. Esta terapia combinada produjo una menor tasa de brotes que el IFN-beta-1a solo y una menor aparición de nuevas lesiones identificadas en imágenes de RM. A los dos años, la terapia combinada redujo un 24% el riesgo relativo de sufrir una progresión de la discapacidad.

En febrero del 2005, este medicamento fue retirado del mercado debido a que se diagnosticó leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) a dos pacientes con EM después de 28 y 37 dosis de natalizumab respectivamente, en combinación con IFN-beta-1a.

En 2006 natalizumab se relanzó en Estados Unidos y fue aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) como monoterapia de segunda línea para pacientes con brotes de EM, con una indicación restrictiva: que fueran pacientes con unos brotes muy activos. En la tabla 3 se pueden consultar algunas de las medidas propuestas para el manejo del riesgo de LMP en los pacientes tratados con natalizumab tanto en Estados Unidos como en Europa ⁴⁷.

Tabla 3. Ensayos de seguridad realizados con natalizumab: TOUCH en Estados Unidos y TYGRIS en Europa (imagen adaptada de Carson y col. ⁴⁷).

Natalizumab	
Safety actions of the FDA and the marketing authorisation holder in the USA	
Date of initial marketing approval by the FDA	November, 2004
Dates warnings on PML issued by FDA	February, 2005; June, 2006; August, 2008
Dates manufacturer issued warning for PML	June, 2006 (Black Box)
Marketing suspension	Voluntary withdrawal (February, 2005 to June, 2006). Returned to market place as monotherapy in conjunction with a risk management plan
Risk-management (USA)	TOUCH programme for all patients; Tysabri should not be administered concurrently with other immunosuppressants
Pharmacovigilance (USA)	TOUCH for all patients; all US patients are enrolled. Global voluntary observational registry TYGRIS
Safety actions of the EMEA and marketing authorisation holder in Europe	
Date of initial marketing approval by the EMEA	June, 2006
EMA issued warnings on PML	June, 2006; August, 2008
Manufacturer issued warnings on PML	August, 2008 ("Dear Healthcare Professional" letter)
Marketing suspension	None
Risk-management (Europe)	Manufacturer recommends that natalizumab-treated patients have baseline MRI of brain within 3 months of initiation of natalizumab. Manufacturer requires all patients be given a Patient Alert Card*
Pharmacovigilance (Europe)	Continuous safety monitoring of all natalizumab-treated patients. Global voluntary observational registry TYGRIS

PML (progressive multifocal leucoencephalopathy): leucoencefalopatía multifocal progresiva; FDA (Food and Drug Administration): Agencia de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos; TOUCH: Tysabri Outreach: Unified Commitment to Health, TYGRIS: Tysabri Global Observational Program in Safety; EMEA (European Medicines Agency): Agencia Europea de Medicamentos.

2.2.2 BENEFICIOS VS RIESGOS DEL TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB

Hasta el 2 de abril de 2013 este fármaco ha sido administrado aproximadamente a 112.181 pacientes en todo el mundo (<http://www.biogenidec.ch/Tysabri.aspx?ID=4763> (acceso el 18 Abril 2013). Los beneficios clínicos que supone el empleo de este fármaco

podemos valorarlos en la figura 6, donde se comparan la tasa de reducción de brotes a la izquierda y la disminución de la progresión sostenida de la discapacidad a la derecha de varios tratamientos que están actualmente en el mercado. Si bien hay que tener en cuenta que estos estudios no fueron diseñados para compararlos entre sí, se constata la gran eficacia del natalizumab frente a otros tratamientos, pudiendo referirnos a él como el más eficaz clínicamente hasta el momento.

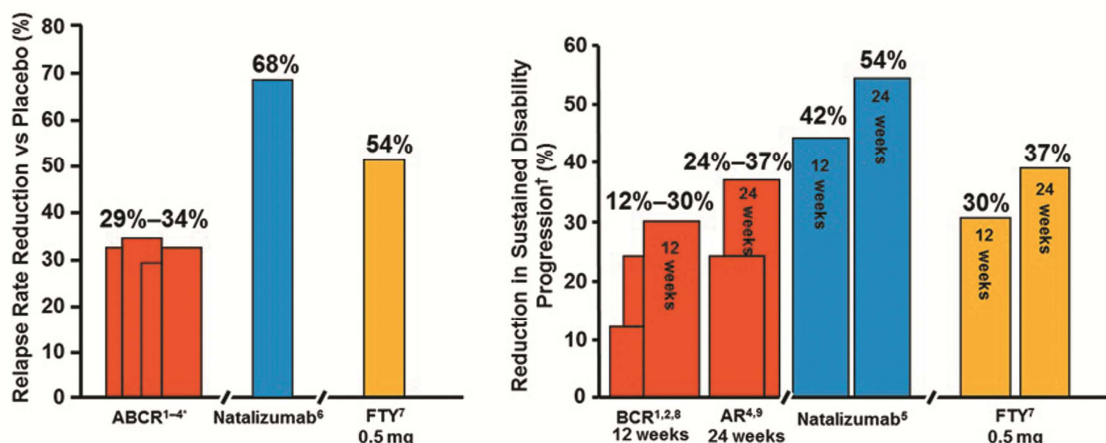


Figura 6. Comparación de la tasa de reducción de brotes (izquierda) y la disminución de la progresión sostenida de la discapacidad (derecha) en distintos grupos de pacientes de EM con distintos tratamientos. †progresión de la discapacidad: aumento de ≥ 1.0 punto en la escala de EDSS; ABCR: AVONEX®, Betaferon®, Copaxone®, Rebif®; FTY: fingolimod; EDSS (*Expanded Disability Status Scale*): Escala expandida del estado de discapacidad. 1. PRISMS Study Group. *Lancet*. 1998;352:1498-1504 ⁴⁹; 2. IFN β MS Study Group. *Neurology*. 1993;43:655-661 ⁵⁰; 3. Johnson KP et al. *Neurology*. 1995;45:1268-1276 ⁵¹; 4. Jacobs LD et al. *Ann Neurol*. 1996;39:285-294 ⁵²; 5. Polman CH et al. *N Engl J Med*. 2006 ;354:899-910 ⁵³; 6. Giovannoni G et al. *N Engl J Med*. 2010;362:416-426 ⁵⁴; 7. Kappos L et al. *N Engl J Med*. 2010;362:387-401 ⁵⁵; 8. Johnson KP et al. *Neurology*. 1995;45:1268-1276 ⁵¹; 9. EPAR regulatory submission documents, 2011. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Product_Information/human/000136/WC500048681.pdf. Accessed October 13, 2011.

Sin embargo, desde que se reintrodujo el natalizumab en monoterapia se han reportado varios casos de LMP en pacientes de EM tratados con natalizumab ^{56,57}, una devastadora enfermedad desmielinizante del SNC causada por el virus JC. Más concretamente hasta el 2 de abril de 2013 se han confirmaron 347 casos de LMP a nivel mundial, estimándose el riesgo de padecer LMP en 2,97 por 1000 pacientes (intervalo de confianza al 95%: 2,66-3,29 por cada 1000 pacientes).

Si bien, para hacer referencia a la incidencia de esta enfermedad nos basaremos en estudios realizados hasta diciembre de 2011, con los que la empresa farmacéutica Biogen-IDEC ha realizado un algoritmo basándose en la combinación del riesgo de

padecer LMP en pacientes de EM tratados con natalizumab en función de los 3 factores de riesgo definidos hasta el momento: presencia/ausencia de anticuerpos anti-JC detectados según la técnica de Gorelik y col.⁵⁸, tiempo de exposición al tratamiento con natalizumab y uso previo de inmunosupresores⁵⁹ (figura 7).

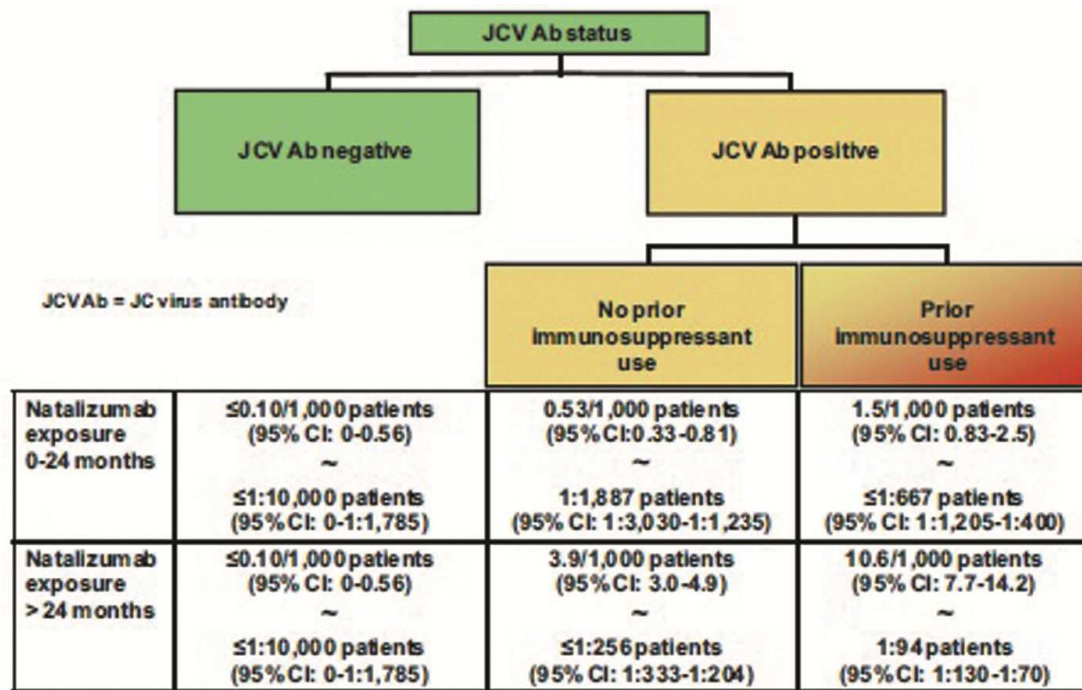


Figura 7. Incidencia estimada de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) estratificada por tres factores de riesgo: presencia/ausencia de anticuerpos anti-JC, uso previo de inmunosupresores y duración del tratamiento con natalizumab. Este logaritmo asume: que todos los 159 casos confirmados de LMP hasta el 1 de septiembre del 2011 fueron positivos para anticuerpos anti-JC previamente al diagnóstico de la LMP; que el 55% de los pacientes fueron positivos para anticuerpos anti-JC; y que el 20% había usado previamente inmunosupresores. [https://medinfo.biogenidec.com/medinfo (accessed December 21, 2011)] JCV: virus JC (figura extraída de Sorensen y col.⁵⁹).

La LMP asociada a natalizumab tiene una tasa de supervivencia mucho mayor que otras LMPs desarrolladas en otras condiciones⁶⁰. Hasta el 1 de septiembre de 2011, 29 de los 159 (18%)⁶¹ y hasta el 1 de diciembre de 2011, 39 de los 193 (20%) (<http://www.biogenidec.ch/Tysabri.aspx?ID=4763> (accessed 21 December 2011)) pacientes con LMP asociada al uso de natalizumab fallecieron debido a esta patología. Una evaluación de 47 supervivientes que tenían al menos 6 meses de seguimiento desde el momento del diagnóstico de la LMP al momento de la valoración clínica mostraron que el 13% tenía una discapacidad leve (*Karnofsky scale* 80–100), el 47% una discapacidad moderada (*Karnofsky scale* 50–70) y el 40% tenía una discapacidad severa (*Karnofsky scale* 10–

40), donde 17 de los 19 pacientes tenían una puntuación de 40. Entre los predictores de supervivencia destacar una edad temprana en el momento del diagnóstico de la LMP, menor discapacidad (medida mediante el EDSS) antes del diagnóstico, y un periodo de tiempo lo más breve posible entre el comienzo de los síntomas y el diagnóstico de la LMP ⁶¹.

Finalmente, comentar brevemente otros efectos adversos leves relacionados con este fármaco. Se han descrito reacciones de hipersensibilidad en un 4% de los pacientes del ensayo clínico AFFIRM ⁵³; entendiendo éstas como cualquier caso de reacción de hipersensibilidad o alérgica, reacciones anafilácticas, urticaria o dermatitis alérgica, también se incluiría fiebre, sarpullido, prurito, náuseas, rubores, hipotensión o dolor de pecho. La recomendación actual en caso de que aparezcan es la suspensión del tratamiento. Por otro lado, en los ensayos clínicos realizados los anticuerpos anti-natalizumab persistentes se han detectado en un 6% de los pacientes, reduciendo la eficacia clínica en términos de progresión de la discapacidad en los mismos; también se han asociado con aumento de acontecimientos adversos relacionados con la infusión en el estudio AFFIRM ^{53,62}.

2.2.3 IRIS (SÍNDROME INFLAMATORIO DE RECONSTITUCIÓN INMUNE)

El IRIS se presenta con la reconstitución del sistema inmune. Se caracteriza por una respuesta linfocitaria destacada (generalmente con predominio de linfocitos CD8+), y se desarrolla en correlación con el control del virus JC, inflamación de tejido y ruptura de la barrera hematoencefálica que resulta en un aumento de contraste con gadolinio en la imágenes de RM ⁶³.

En el caso de los enfermos de EM que están siendo tratados con natalizumab, el IRIS es el resultado de la reconstitución del tráfico leucocitario en el SNC después de interrumpir o eliminar la concentración de natalizumab en suero debido a la sospecha de LMP confirmada o no con posterioridad. El IRIS se presenta con un empeoramiento del estado neurológico del paciente como resultado de una reacción inflamatoria local que incluye edema, y de una manifestación de síntomas neurológicos nuevos o de empeoramiento, entre los que se destacan hemiparesias, alteraciones del lenguaje, cambios cognitivos o del comportamiento, ataques, déficits visuales, ataxia, y fiebre en función del sitio del IRIS. Se han reportado importantes secuelas neurológicas

incluyendo coma e incluso la muerte. A menudo, existe un aumento en la captación de gadolinio en las lesiones de LMP observadas por RM. Los síntomas clínicos del IRIS pueden preceder a los hallazgos de RM; además, la ausencia de aumento en la captación de gadolinio no excluye el IRIS.

En el contexto de los datos post-marketing, casi todos los pacientes con LMP se sometieron a plasmaféresis o inmunoabsorción para retirar el natalizumab del plasma, con el fin de acelerar la reconstitución de la vigilancia inmune, y por ende, tener bajo control la LMP más rápidamente. EL IRIS se desarrolló en torno a las 2-12 semanas (media: 4,2 semanas) de cesar el tratamiento con natalizumab y antes en pacientes que se sometieron a plasmaféresis. Lo que no está muy claro es cuál de estos dos métodos, plasmaféresis o inmunoabsorción, convierte al IRIS en una patología más manejable.

2.2.4 EFECTO DEL NATALIZUMAB SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Como hemos comentado con anterioridad, el tratamiento con natalizumab interrumpe la migración de linfocitos hacia el SNC. Con lo cual, se puede apreciar una disminución persistente del número de células T CD4+, células T CD8+, células B CD19+ y de células plasmáticas presentes en el LCR ^{64,65}. De hecho, el ratio CD4:CD8 en el LCR de pacientes de EM tratados con este fármaco se reduce a niveles parecidos a infecciones con HIV ⁶⁶.

Es de destacar que se han publicado dos casos de reactivación patológica del herpes virus simple-1 y del -2, causantes de encefalitis herpética ⁶⁷ y meningitis ⁶⁸ respectivamente, en dos pacientes de EM tratados con natalizumab; si bien, la prevalencia de estas patologías en los pacientes tratados con natalizumab, no excede a la de la población normal, se trataría únicamente de casos esporádicos de ambas enfermedades.

Otros mecanismos que podrían estar implicados en el papel beneficioso del natalizumab serían la capacidad de esta molécula para inducir variaciones de los perfiles de citoquinas de suero y LCR, al igual que el efecto que tiene en la activación de células T ^{69,70}.

Además del papel en la interacción entre leucocitos y endotelio, las VLA-4 (molécula con la que interacciona el natalizumab) están implicadas en mediar la retención de las células precursoras hematopoyéticas en la médula espinal. Con lo que el tratamiento con

natalizumab induce un aumento de las células CD34+ en sangre periférica ⁷¹. Sin embargo, las VLA-4 también juegan un papel fundamental en la entrada y en la retención de los linfocitos B en bazo y nódulos linfáticos al igual que en el camino hacia la médula espinal de las células plasmáticas ^{72,73}. En pacientes con EM tratados con natalizumab los linfocitos B aumentan en sangre periférica a medida que avanza el tratamiento ^{74,75}. Ese fenómeno sería indicador de la posible interferencia del natalizumab en el proceso de maduración de los linfocitos B, que podría provocar anomalías en el proceso de diferenciación de las células plasmáticas y, consecuentemente, alteraciones en la síntesis normal de inmunoglobulinas.

3. LMP

Como se ha comentado con anterioridad la LMP es una enfermedad desmielinizante del SNC causada por el virus JC. Más concretamente, la variante del virus JC causante de la LMP es la denominada por algunos autores neurotrópica, mientras que la arquetípica es excretada por la orina por un elevado porcentaje de la población sana, sin que esto sea indicativo de la existencia de patología alguna.

3.1 Historia

La LMP fue descrita por primera vez en 1958 por Astrom, Mancall and Richardson ⁷⁶. En esta publicación los autores hacen referencia a 3 pacientes, todos ellos con algún tipo de alteración linfoproliferativa subyacente, y con déficits neurológicos como consecuencia de una alteración progresiva inexplicable de la sustancia blanca. En el momento en el que se escribió este artículo se desconocía la etiología de la patología descrita. Fue en 1965, cuando Zurhein sugirió que un papovavirus era el causante de esta patología basándose en inclusiones intracelulares de tipo paracrystalinas observadas en el microscopio electrónico ⁷⁷. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente mediante la replicación del virus en células de glía fetal humana. Este virus fue clasificado como poliomavirus y su nombre, virus JC, hace referencia a las iniciales del individuo del que se aisló por primera vez, John Cunningham ⁷⁸.

Durante los primeros 20 años posteriores a la publicación de Astrom y col. ⁷⁶, la LMP era considerada como una enfermedad rara, que padecían únicamente personas con alteraciones hematológicas o del tejido conectivo. Sin embargo, a partir de los 80 con la expansión de la epidemia del SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) los casos de LMP comenzaron a aumentar como una infección oportunista en los enfermos de VIH (virus de la inmunodeficiencia humana). La incidencia de la LMP aumentó 50 veces de 1979 a 1994. Posteriormente, el empleo de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ayudó a reducir la progresión y la severidad de la LMP en individuos con SIDA, si bien la infección con VIH continúa explicando un 80% de los nuevos casos de LMP diagnosticados. Sin embargo, incluso con el empleo de TARGA,

la incidencia de LMP se mantiene en un 3-5% entre los enfermos de SIDA, la cual es muy similar a la recogida previamente a la era TARGA.⁷⁹

Por último, más recientemente el uso de ciertos agentes quimioterapéuticos citotóxicos y otros medicamentos inmunosupresores se ha asociado con la LMP, como por ejemplo: fludarabina, ciclofosfamida, metotrexato, micofenolato, corticoides^{80,81}, natalizumab, efalizumab, rituximab y alemtuzumab⁴⁷.

3.2 Diagnóstico

Para diagnosticar correctamente la LMP se han de tener en cuenta distintos aspectos que se revisan en este apartado.

Síntomas clínicos

La LMP se debe a la infección del virus JC de los oligodendrocitos (células formadoras de la vaina de mielina) y, en menor medida, de los astrocitos. Por lo tanto, los déficits neurológicos están asociados con las áreas donde se ha producido la desmielinización en el cerebro⁸².

Generalmente, al principio la LMP progresa lentamente, produciéndose una pérdida gradual de la función mental y una alteración en el lenguaje y la visión. En ocasiones, también puede verse afectada la función motora, siendo este síntoma clínico el que mejor puede valorarse. A medida que la enfermedad progresa, la velocidad del deterioro neurológico se acelera. El curso clínico puede durar desde semanas a meses, y conlleva una discapacidad severa con síntomas tales como la demencia, ceguera y parálisis, y finalmente el coma y la muerte⁸³.

Imágenes radiológicas

Las lesiones cerebrales se detectan mediante imágenes de RM o de tomografía axial computarizada (TAC) en la sustancia blanca, y no suelen apreciarse en territorios vasculares específicos. Las lesiones aparecen como hipodensas en TAC, mientras que en imágenes de RM aparecen áreas hiperintensas en T2 e hipointensas en T1. Lo más común para el diagnóstico es apreciar lesiones hiperintensas en T2 no realzadas en región frontal, temporal, parietal, u occipital, pudiendo ser uni o multifocales. Las lesiones múltiples se ubican en la sustancia blanca hemisférica subcortical o en los pedúnculos cerebelosos. Además, las lesiones de la LMP pueden encontrarse en

estructuras de la sustancia gris, tales como los ganglios basales o el tálamo, en los que hay fibras mielinizadas.

Resultados de la detección del virus en el laboratorio

Ante la sospecha de que un enfermo pueda padecer LMP se le extrae una muestra de LCR y se analiza con el fin de detectar la presencia del virus JC mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, hemos de tener en cuenta que el virus JC está en concentraciones muy bajas en el LCR, aproximadamente la mitad de los pacientes de LMP tienen menos de 500 copias/ml. Con lo cual, el límite de detección de la técnica utilizada es clave para confirmar que un individuo padece LMP.

Si el ADN del virus JC no se detecta en LCR, pero sin embargo la sospecha de LMP continúa siendo alta, se recomienda repetir la punción lumbar y el análisis de la presencia viral. Si el resultado continúa siendo negativo y el paciente presenta síntomas claros de LMP, clínicos y/o radiológicos, se aconseja realizar una biopsia cerebral. Se valorará histológica y virológicamente el material obtenido de la biopsia para proporcionar evidencias de la presencia del virus. Este material se podrá estudiar mediante microscopía electrónica, microscopía inmunoelectrónica o directamente el ADN o proteínas virales mediante hibridación in situ o inmunohistoquímica ⁸⁴. Histológicamente la LMP se caracteriza por una infección lítica de oligodendrocitos y astrocitos, que conduce a múltiples áreas de desmielinización en el SNC. Además, puede haber gliosis reactiva y astrocitos multinucleados gigantes en las áreas afectadas ⁸⁵ (figura 9). Se aconseja determinar la presencia del virus en el LCR antes de realizar una biopsia, pues este último método es muy invasivo.

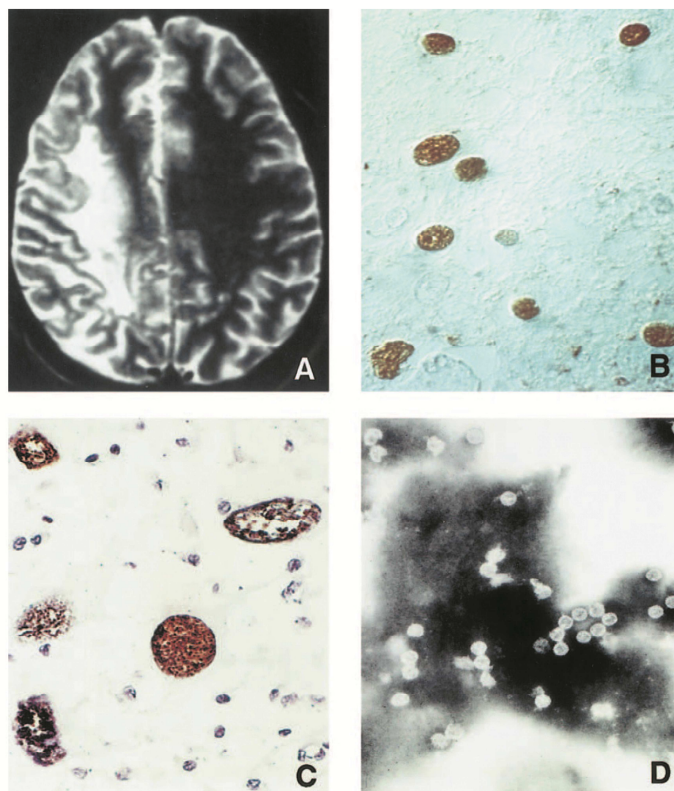


Figura 8. Tres principales características de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) y su agente etiológico, el virus JC. *A* Imagen de resonancia magnética de un paciente con LMP, se aprecian las lesiones de la sustancia blanca subcortical. *B* Núcleos densos agrandados de oligodendroglía de tejido biopsiado de un paciente con LMP. En la hibridación in situ se ha empleado la diaminobencidina (DAB) como cromóforo, el precipitado marrón es el ADN del virus JC. *C* Astrocitos raros y agrandados de tejido biopsiado de un paciente con LMP. La tinción con hematoxilina identifica los núcleos de las células no infectadas. El ADN de virus JC se detectó mediante hibridación in situ con DAB. *D* Micrografía electrónica de viriones de JC visualizado por tinción de acetato de uranilo negativo. Cada virión tiene un diámetro aproximado de 40 nm (figura extraída de Sabath y col.⁸⁶).

Por último, determinados casos que presenten típicos signos clínicos y radiológicos podrían considerarse como “posibles LMP”, incluso sin que se detecte el virus JC en LCR si otras causas de infección o tumores han sido descartadas⁸⁷.

3.3 Tratamientos

En ausencia de reconstitución del sistema inmune, el tratamiento de la LMP no suele tener éxito. En pacientes con VIH el uso de agentes quimioterapéuticos (como la citarabina y cidofovir) no ha demostrado ser efectivo para tratar esta enfermedad^{82,88}. Sin embargo, el empleo de TARGA ha resultado ser útil a la hora de reducir la severidad de la LMP en dichos pacientes⁸⁹. Las opciones de un tratamiento efectivo

para enfermos VIH negativos son limitadas. El tratamiento con citarabina en pacientes VIH negativos se apoya en el uso de este medicamento en una serie de casos clínicos, y actualmente se usa en algunos centros ⁹⁰. En estos momentos un ensayo clínico aleatorizado está en proceso para evaluar el efecto de la mefloquina en los niveles de ADN del virus JC en el LCR de pacientes con LMP; sin embargo, este estudio no está diseñado considerando la supervivencia como un resultado primario. A lo largo de estas últimas décadas, se han intentado diversas estrategias de tratamiento, aunque no se recomienda claramente ninguna debido a los datos tan pobres que las sustentan. Una publicación reciente ⁹¹ describe posibles tratamientos para la LMP, incluyendo terapias antivirales, inmunomoduladores, leucoféresis, y tratamientos experimentales, como terapias con pequeños ARN (ácido ribonucleico) de interferencia antivirales.

4. VIRUS JC

4.1 Taxonomía

Los poliomavirus son un género de la familia *Papovaviridae*, sin envuelta y con una cápside icosaédrica que contiene un pequeño genoma de DNA de doble hélice circular. Estos virus han sido aislados en humanos, monos, roedores y pájaros. Cada poliomavirus posee un rango de hospedador limitado y no suele producir infecciones activas en otras especies ⁹².

Podríamos agruparlos del siguiente modo:

- Los virus BK, JC y SV40. Fueron los primeros que se describieron con capacidad para infectar primates. El acrónimo BK, al igual que el JC, deriva de las iniciales del paciente donde se aisló e identificó por primera vez. El virus SV40 es el causante de tumores de riñón en monos; el virus BK y el virus JC en humanos comprometidos inmunológicamente (inmunosuprimidos) causan nefropatías y LMP respectivamente. Estos tres virus son bastante similares entre sí con respecto al tamaño (5,1 kilopares de bases), organización y secuencia del ADN, de esta forma el virus JC comparte aproximadamente el 70% de su secuencia con SV40 y BK ⁹³.
- Los virus KI, WU y MC. Se trata de los nuevos poliomavirus humanos descubiertos recientemente. El KI y el WU, descubiertos respectivamente en el *Karolinska Institutet* y en la *Washington University*, fueron identificados al realizar otro tipo de estudios en aspirados nasofaríngeos procedentes de pacientes con algún tipo de infección respiratoria ^{94,95}. El acrónimo MC deriva del tipo de células donde provoca el tumor, el carcinoma de las células de Merkel, de donde fue aislado por primera vez.
- El virus LP. Es el poliomavirus de células B linfotrópicas de mono.

4.2 Estructura/genoma

Como el resto de los poliomavirus, el genoma del virus JC está organizado en tres partes: la región codificante temprana (que codifica para Antígeno T, t, T₀₁₃₅, T₀₁₃₆, y

T₀₁₆₅), la región codificante tardía (que codifica para VP1, VP2, VP3 y agnoproteína) y una región reguladora (RR) común ⁹⁶.

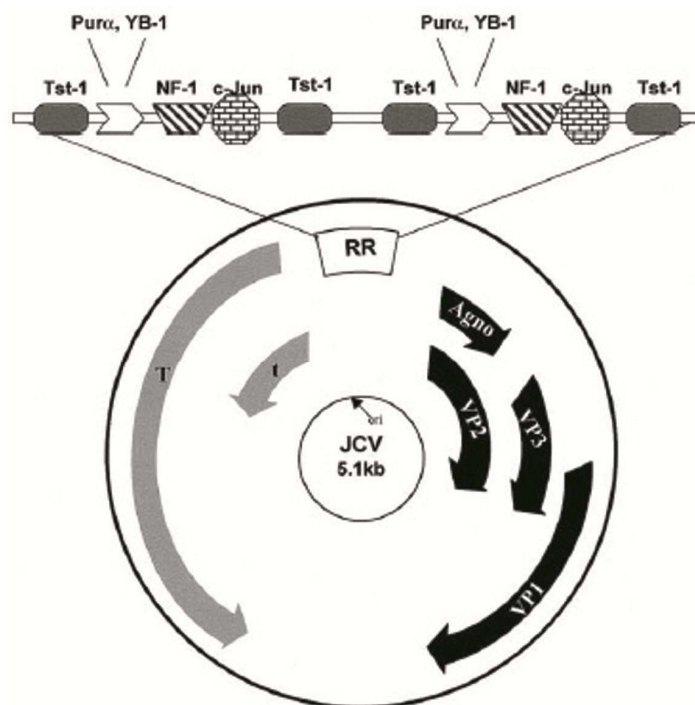


Figura 9. Organización del genoma del virus JC incluyendo algunas proteínas reguladoras (Tst-1, Purα, YB-1, NF-1, c-Jun) que modulan la replicación y transcripción del ADN. RR: región reguladora; Agno: Agnoproteína; T: Antígeno T (imagen extraída de Sabath y col. ⁸⁶).

La RR se localiza entre las dos secuencias codificantes, como se puede observar en la imagen (figura 9). Esta región contiene el origen de replicación del ADN (ORI) y los sitios donde se unirán los distintos factores de transcripción que controlan la expresión génica del virus. En primer lugar la transcripción temprana se produciría en el sentido contrario a las agujas del reloj, mientras que la transcripción tardía avanzaría en el sentido de las agujas del reloj en la hebra opuesta de ADN. Así pues, a la RR se la considera como la moduladora de la actividad viral, pero también responsable del tropismo celular ^{86,97}. A su vez, posee la secuencia con mayor variabilidad del genoma del virus JC, posiblemente debido a los reordenamientos, replicaciones o deleciones adquiridas durante la propagación viral ⁹⁸. La distinta estructura de esta región reguladora determina la existencia de diferentes variantes del virus JC, una arquetípica y otras neurotrópicas, siendo estas últimas las causantes de la LMP ⁹⁷. Además, otra serie de mutaciones en la proteína de la cápside VP1 también parecen estar implicadas en el aumento del riesgo a padecer LMP ⁹⁹.

La región temprana codifica para una serie de proteínas reguladoras multifuncionales:

- Antígeno T. Se trata de la proteína reguladora clave, que dirige la replicación del ADN viral y la transcripción de los genes tardíos, puesto que interactúa con varias proteínas celulares ¹⁰⁰.
- t, T₀₁₃₅, T₀₁₃₆, y T₀₁₆₅, variantes por *splicing* alternativo del Antígeno T. La proteína t parece no tener un papel en la multiplicación viral o en la patogenicidad en humanos, pero al igual que el Antígeno T, parece estar implicada en la transformación a células tumorales en roedores y primates no humanos infectados. ^{101,102}.

La región tardía codifica para:

- VP1, VP2 y VP3, proteínas de la cápside. VP1 es la responsable de formar la estructura icosaédrica junto con VP2 y VP3, que son componentes estructurales minoritarios. Además, VP1 contiene los epítomos para el reconocimiento e inducción de anticuerpos ⁸⁶.
- Agnoproteína, una pequeña proteína reguladora implicada tanto en la perturbación de las funciones celulares del hospedador, como en la reparación del ADN y la progresión del ciclo celular. También parece estar implicada en el ensamblaje de la cápside ⁸⁶.

4.3 Variantes

La secuencia de la RR, como hemos dicho previamente, muestra una gran diversidad; en este trabajo no referiremos a ellas como tipo arquetípica y tipo neurotrópica. En la orina de individuos sanos se han aislado virus con la RR tipo arquetípica no patogénica ⁹⁶, mientras que en LCR, cerebro o sangre de pacientes con LMP las variantes tipo neurotrópica patogénicas ¹⁰³. Esta última procede del reordenamiento (patrones recurrentes de delección y duplicación) de la arquetípica, que ha sido dividida en 7 fragmentos para facilitar la descripción de dichos reordenamientos ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Las 7 regiones son: ORI (región altamente conservada), A, B, C, D, E y F (dividida a su vez en F1 y F2) secuencialmente y siguiendo la dirección 5'-3' (figura 10).

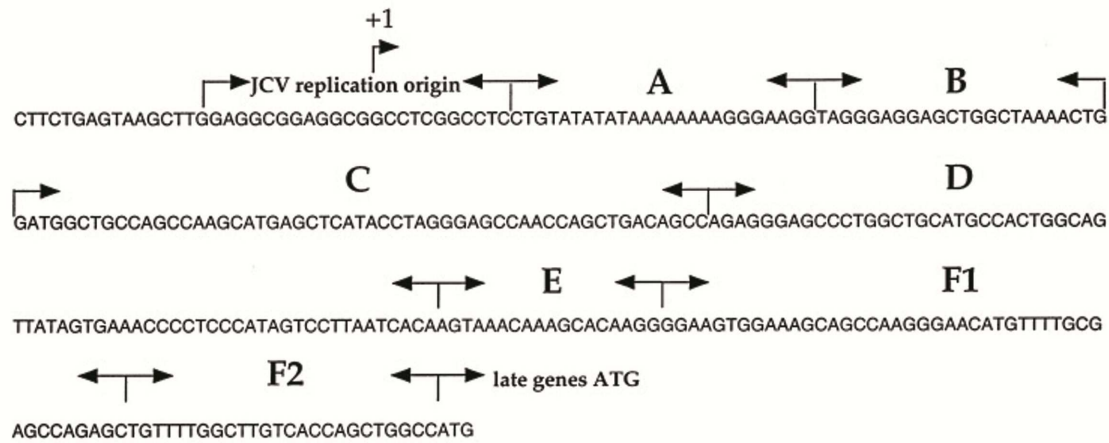


Figura 10. Secuencia de la región reguladora (RR) arquétipo. La secuencia de nucleótidos de RR (NC_001699.1 y Frisque y col.¹⁰⁷) se muestra dividida en los fragmentos A, B, C, D, E y F (F1 y F2)^{108,109}. También se detalla el origen de replicación del virus JC y el primer codón ATG del gen tardío (figura extraída de Sala y col.¹⁰⁶).

Las primeras partículas virales del cerebro del primer paciente diagnosticado con LMP fueron aisladas en cultivos de tejido fetal cerebral humano en la Universidad de Wisconsin, Madison. También allí, se secuenciaron las RR de las primeras variantes neurotrópicas del virus y se identificaron como Mad-1, Mad-2,... haciendo referencia a la localización geográfica, Madison, donde estas variantes fueron identificadas (figura 11). Posteriormente, han sido descritas otras variantes neurotrópicas sin seguir esta nomenclatura; sin embargo, todas ellas guardan cierta relación (patrones de duplicación y delección a partir de la arquétipo) independientemente del tipo de paciente del que fueron aisladas: VIH, EM tratado con natalizumab,... y del sitio de extracción: cerebro, sangre, plasma, suero, LCR,...¹¹⁰.

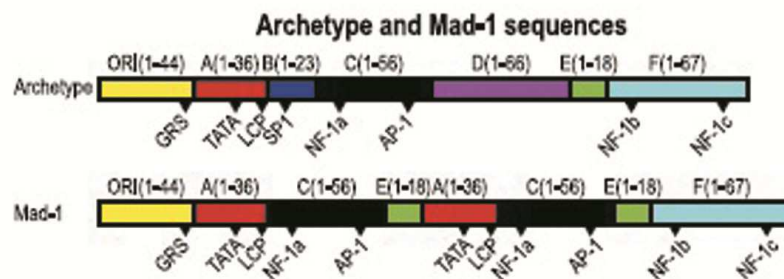


Figura 11. Regiones reguladoras tipo arquétipo y neurotrópica (Mad-1) divididas por fragmentos: A, B, C, D, E y F (en distintos colores) (figura adaptada de Reid y col.¹¹⁰).

Con el objetivo de clasificar estas nuevas secuencias virales de RR, Jensen y Major ⁹⁷ describieron 4 grupos de variantes. Como vemos en la tabla 4, la variante tipo I, no contiene insertos en el fragmento A-C-E de la RR, y a su vez se divide en tipo IS (única copia de A-C-E) y variante tipo IR (A-C-E repetido pero sin insertos, ej: Mad-1 y Mad-4). Las variantes tipo II, contienen dos insertos en el fragmento A-C-E y se clasificarían en tipo IIS (A-B-C-D-E o tipo arquetípica) y tipo IIR (con insertos y repeticiones, ej: Mad-7, Mad-8).

Tabla 4. Variantes de la región reguladora del virus JC (tabla adaptada de Ferenzy y col. ¹¹¹).

Variant type	Tissue association	NCCR sequence block variations ^a	Disease association
IS	GI tract, bone marrow	a c e f	Colon cancer?
IR	GI tract, tonsil (S, L), bone marrow	a c e a c e f	PML
IIS	Lymph node, lung, tonsil (L), liver, urine	a b c d e f	Urine (nonpathogenic)
IIR	Lymph node, lung, tonsil (S), liver, spleen, urine	a b c +e b c +e f	PML

^a +: inserción de una base; letras en minúscula: fragmento de secuencia entero; letras en cursiva: fragmento de secuencia parcial. Todas estas variantes se identificaron en cerebro y linfocitos de sangre periférica.

El reordenamiento de estas secuencias de la arquetípica a la neurotrópica se cree que puede aumentar el tropismo restrictivo de un tejido o la virulencia, afectando al conjunto del potencial patogénico del virus ¹¹². Sin embargo, también se postula que este reordenamiento de la secuencia no afecta a la biología del virus ¹¹³.

Además, estas variables neurotrópicas con la RR reordenada respecto a la arquetípica, también se caracterizan por presentar ciertas mutaciones puntuales en una de las proteínas de la cápside: la VP1. Aunque recientemente ha sido publicado que el reordenamiento de la RR es más común y parece preceder a las mutaciones de la VP1 en un estudio realizado en pacientes de EM tratados con natalizumab que desarrollaron LMP ¹¹⁰.

4.4 Ciclo de vida del poliomavirus

El ciclo de vida del poliomavirus está compuesto por acontecimientos tempranos y tardíos. Durante los primeros, se inicia la infección viral mediante la unión del virus JC a sus receptores de la superficie celular; a continuación el virus pasaría de la membrana celular al núcleo. Posteriormente, el Antígeno T se sintetizaría, activando la replicación del ADN genómico viral en el núcleo. Durante los acontecimientos tardíos se sintetizarían VP1, VP2 y VP3, las proteínas virales de la cápside, en el citoplasma y se desplazarían hasta el núcleo para producir la progenie viral. La susceptibilidad de la célula a una infección lítica podría determinarse en alguna fase del ciclo lítico ⁹⁶ (figura 13).

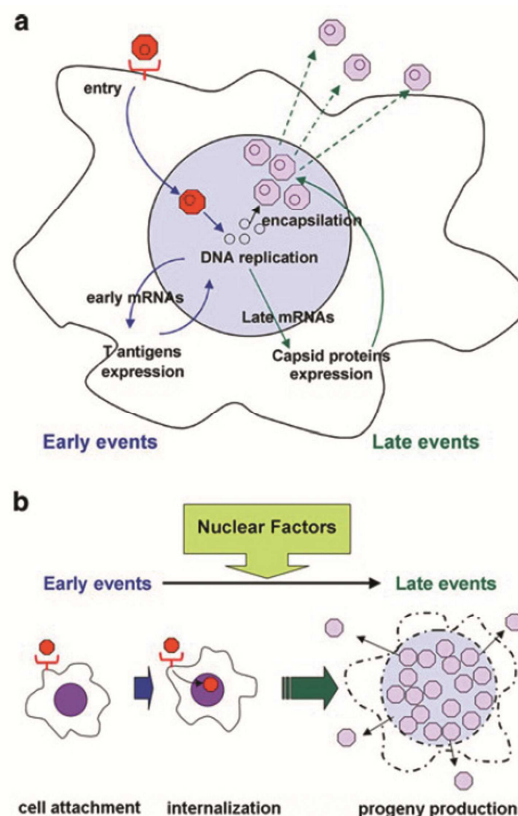


Figura 12. Ciclo de vida del virus JC. a) El ciclo de vida del virus JC comienza cuando se unen a los receptores de la superficie celular y termina cuando se libera la progenie de la célula hospedadora. La susceptibilidad celular, para una producción eficiente de la progenie viral, puede ser regulada en alguna fase del ciclo lítico. b) Aunque se sabe que el virus JC infecta a distintos tipos celulares, la producción más eficiente de progenie parece tener lugar en la oligodendroglía, un fenómeno que se cree está determinado por múltiples factores nucleares (figura extraída de Shishido-Hara ⁹⁶).

El virus JC puede unirse a receptores presentes en una gran variedad de tipos celulares, sin embargo la progenie no se produce necesariamente en todos los tipos celulares. La

entrada viral es mediada por un receptor ubicuo, una (2-6)-ácido siálico-N-glicoproteína, que se relaciona con el receptor serotoninérgico 5HT2A de células gliales humanas ¹¹⁴. Sin embargo, incluso cuando el virus se une a los receptores de la superficie celular, o penetra y alcanza el núcleo, estos acontecimientos no siempre conducen a la finalización del ciclo lítico del virus. Se han llevado a cabo diversos estudios in vitro que muestran la entrada del virus JC al núcleo en 15 tipos distintos de líneas celulares; sin embargo, la replicación del virus tuvo lugar exclusivamente en células humanas de neuroblastoma ¹¹⁵. Estos resultados indican que la presencia de receptores en la superficie celular es esencial pero no determina específicamente la susceptibilidad celular para una infección lítica eficiente.

Las repeticiones en tándem en la RR de una de las variantes neurotrópicas, Mad-1, han resultado ser un elemento regulador transcripcional que aumenta esta actividad en las células gliales humanas ¹¹⁶. Los resultados de muchos estudios respaldan la idea de que la infección lítica restringida del virus JC en tejido de cerebro humano depende de la presencia de factores nucleares que se expresan preferentemente en células gliales. La secuencia reordenada de la RR afecta considerablemente a los niveles de transcripción y replicación viral, ya que poseen los sitios de unión de las proteínas nucleares que regulan la actividad replicativa y transcripcional del ADN viral. Las secuencias incluyen cajas TATA, y sitios de unión para transactivadores nucleares, incluyendo Sp1, YB1, sup2, NF- κ B, Pura, Tst-1, c-Jun, y NF-1 ¹¹⁷. Es decir, la eficiencia de la infección lítica en células específicas parece ser dependiente de factores nucleares que se unen selectivamente a secuencias de la RR reordenadas.

Curiosamente, estudios recientes han revelado que el virus JC también infecta neuronas en las capas granulares del cerebelo e incluso neuronas piramidales en la corteza cerebral. En el cerebelo la infección lítica de las células granulares se consideró como una neuropatía celular granular, y en la corteza cerebral como una encefalopatía del virus JC fulminante ^{118,119}. Estos datos sugieren que esta infección lítica eficiente tiene lugar incluso en células neuronales, un proceso menos comprendido que la infección lítica en células gliales.

Por otro lado, el mecanismo por el cual el virus JC media la muerte celular continúa siendo desconocido. Las células infectadas con el virus JC pueden experimentar

apoptosis ^{120,121}. Sin embargo, estos resultados contrastan con otros publicados por autores que sugieren que la muerte celular mediada por el virus JC es no-apoptótica, existiendo muerte necrótica en los cultivos celulares de astrocitos derivados de progenitores ¹²². Un estudio reciente también demuestra una expresión más elevada de la proteína anti-apoptótica survivina, y los autores afirman que las células infectadas son anti-apoptóticas, permitiendo la finalización del ciclo viral lítico ¹²³.

4.5 Vías de entrada al cerebro

Desde el principio la idea de la lenta infección del virus ha despertado un gran interés, al igual que la cuestión de cómo el virus JC persiste asintomático en individuos inmunocompetentes, y sólo en algunos casos, causa una enfermedad desmielinizante oportunista. El virus JC es ubicuo en la población humana, aproximadamente entre un 50-80% de la población adulta presenta anticuerpos contra el virus ^{124,125}. Aunque la seroprevalencia continúa aumentando hasta la séptima década de vida, se cree que la mayoría de los individuos ya han padecido infecciones asintomáticas durante la infancia. La infección primaria puede ocurrir vía inhalación respiratoria ^{86,126} o por consumo de comida o bebida contaminada ¹²⁷. Los virus se supone que están latentes o activos en los órganos linfoides tales como el bazo, las amígdalas, también en la médula espinal, y circulan en asociación con los linfocitos periféricos, monocitos, o libres en el plasma ¹²⁸⁻¹³¹. Además, este virus se replica en el riñón y se excreta ocasionalmente por la orina. Los virus circulantes pueden alcanzar el cerebro y si el sistema inmune del hospedador está comprometido, el virus puede causar LMP (figura 13).

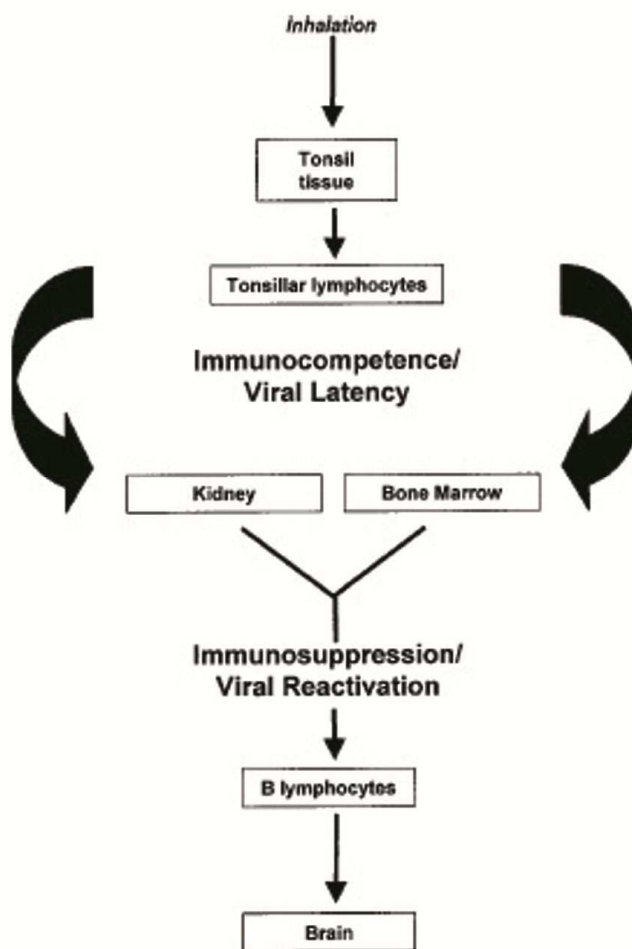


Figura 13. Diagrama del posible recorrido del tráfico del virus JC basado en el tropismo viral observado. El recorrido comienza en las amígdalas vía inhalación. Los linfocitos de la amígdala serían infectados y transportarían los viriones a los sitios de latencia (riñones y médula espinal). En condiciones de inmunosupresión, el virus JC puede reactivarse e infectar los linfocitos B circulantes. Estas células pueden cruzar la barrera hematoencefálica e infectar a los oligodendrocitos, causando desmielinización y leucoencefalopatía multifocal progresiva (figura extraída de Sabath y col. ⁸⁶).

En 1990, uno de los estudios que puede considerarse de los más importantes e interesantes en este campo, defendió la presencia del llamado virus arquetípico ¹⁰³. Estos virus se excretaban frecuentemente en la orina de individuos sanos ^{132,133} y se detectaron en aguas residuales humanas ¹³⁴. Parecía entonces que era la variante arquetípica la que estaba presente en la población humana. Se propuso que posterior a la infección primaria la arquetípica permanecería quiescente en los riñones y en otros órganos, excretándose de vez en cuando en la orina. Algún tiempo más tarde, el virus podría transformarse en la variante neurotrópica vía reordenamiento de la secuencia (en particular delección y duplicación) y esta variante adquiriría neurovirulencia pudiendo causar la LMP (figura 14).

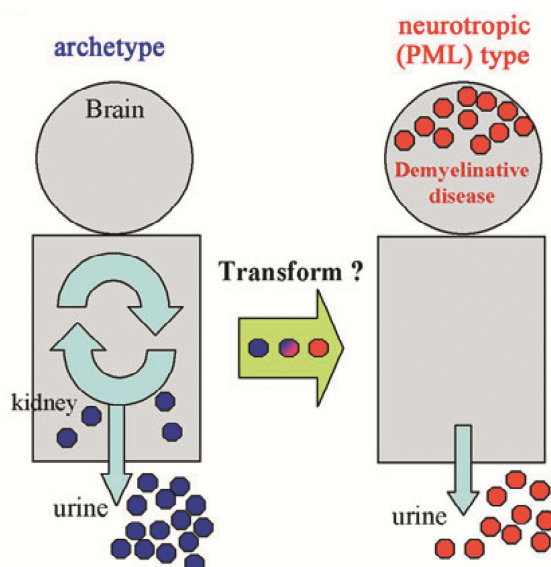


Figura 14. Hipótesis arquetípica. El virus de la variante arquetípica es detectado frecuentemente en orina de individuos sanos, mientras que la variante neurotrópica es detectada en cerebros con leucoencefalopatía multifocal progresiva. De tal forma que, los virus de la variante arquetípica, que son ubicuos en la población humana, puede ocasionalmente transformarse en el tipo neurotrópico, ocasionando una enfermedad desmielinizante oportunista (figura adaptada de Shishido-Hara y col. ⁹⁶).

Posterior a la promoción de la idea arquetípica, el principal tema de debate fue, y continúa siendo, cómo y dónde el virus se transformaba de la variante arquetípica a la neurotrópica. Si el virus se transmite vía inhalación respiratoria, sería razonable que la variante arquetípica se detectara en tejido procedente de las amígdalas, el sitio inicial de la infección. Sin embargo, en un trabajo sobre la secuencia viral en este tejido identificó como la mayoritaria la de tipo neurotrópico ¹³⁵, aunque la secuencia de la arquetípica también fue detectada por otros investigadores ¹³⁶. El virus JC puede transmitirse por el consumo de comida y líquido contaminado ^{127,134}, concordando con esto, el virus JC se detecta frecuentemente en el tracto gastrointestinal ¹³⁷. Sin embargo, de acuerdo con otro estudio la secuencia detectada en el tracto gastrointestinal se identificó como perteneciente a la variante neurotrópica Mad-1 ¹³⁸. El virus JC puede circular también por el cuerpo en asociación con los linfocitos de sangre periférica, dónde podría llevarse a cabo el reordenamiento de la secuencia. Un estudio que profundiza sobre los virus en estos linfocitos revela que la mayoría son de la variante neurotrópica ¹³⁹, y otro apunta a la presencia de ambas variantes, arquetípica y neurotrópica ¹⁴⁰. Otro trabajo sugiere la médula espinal como lugar donde tendría lugar la transformación ya que la variante

neurotrópica también se ha detectado allí ¹⁴¹. Este tema resulta aún más confuso teniendo en cuenta que se ha detectado repetidamente la presencia de ADN viral en tejido cerebral post mortem, procedente de pacientes que murieron de enfermedades no neurológicas. Lejos de lo que cabía esperar, estos virus poseían la secuencia neurotrópica; estos resultados sugieren la posibilidad de que el cerebro sea también un sitio de latencia ¹⁴²⁻¹⁴⁵. La detección repetida del virus neurotrópico en múltiples órganos en individuos portadores apoya los argumentos contra la hipótesis arquetípica (tabla 5). Destacar que, pacientes pediátricos con inmunosupresión congénita presentan LMP en la cual ambas variantes del virus, la arquetípica y la neurotrópica, están presente en distintos tejidos.

Tabla 5. Tabla resumen del tipo de variante, arquetípica o neurotrópica, detectada en cada tejido de estudio en sujetos con y sin LMP hasta el momento (tabla extraída de White y col. ¹⁴⁶).

Variant type	Tissue association	NCCR sequence block variations ^a	Disease association
IS	GI tract, bone marrow	a c e f	Colon cancer?
IR	GI tract, tonsil (S, L), bone marrow	a c e a c e f	PML
IIS	Lymph node, lung, tonsil (L), liver, urine	a b c d e f	Urine (nonpathogenic)
IIR	Lymph node, lung, tonsil (S), liver, spleen, urine	a b c +e b c +e f	PML

Los datos representan la presencia (+) o ausencia (-) de las configuraciones arquetípica o tipo LMP (reordenada) de las regiones reguladoras del virus JC en varios tejidos de sujetos con y sin LMP. ND: no datos. PBMCS: células mononucleares de sangre periférica.

b: el reordenamiento arquetípico de la región reguladora del virus JC fue descrito por primera vez en orina por Yogo y col. ¹⁰³, White y col. secuenciaron clones del ADN amplificados de secciones de tejido de riñón de pacientes no-LMP y también encontraron el virus JC arquetípico ¹⁴⁵. En un estudio más extenso Yogo y col. secuenciaron 298 clones de orina y en todos ellos encontró la arquetípica, aunque detectó ocasionalmente unos pequeños reordenamientos esporádicos ¹⁴⁷. c: Ciappi y col. ¹⁴⁸ observaron la variante arquetípica del virus JC en PBMCS de no LMPs mediante clonación y secuenciación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). d: Tan y col. analizaron aspirados de médula espinal de pacientes virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) negativos, VIH positivos y LMP positivos ¹⁴¹ procedentes de un total de 10 individuos. e: Todos los clones que secuenciaron Monaco y col. fueron del tipo LMP ¹³⁵. Sin embargo, Kato y col., con la misma aproximación, encontraron que todos los clones que aislaron eran del tipo arquetípico ¹³⁶. f: White y col. secuenciaron clones procedentes del ADN de secciones de tejido cerebral no LMP y detectaron virus tipo LMP en estos cerebros ¹⁴⁵. g: La mayoría del virus JC procedente de la orina de individuos sin LMP fue arquetípico pero la secuenciación de clones de productos de PCR de pacientes inmunosuprimidos demostró la variante tipo LMP también podía estar presente ^{77,133,149}. h Dörries y col. ¹³⁹ y Pietropaolo y col. ¹⁵⁰ describieron RR reordenadas mediante secuenciación directa de los productos de PCR de las PBMCS. i: Vaz y col. ¹⁵¹ y Ferrante y col. ¹⁵². j: Marzocchetti y col. ¹⁵³ describieron virus JC inmunomarcado en células plasmáticas CD1381 de médula espinal. Virus JC tipo LMP fue predominante en sangre. El virus JC tipo LMP fue encontrado en médula espinal. k: La LMP está causada por el virus JC tipo KMP. No existen casos conocidos de LMP causada por el virus JC arquetípico. Sin embargo hay un caso de un paciente pediátrico con LMP con virus reordenado en cerebro pero con virus JC detectable por PCR específica del tipo arquetípico ¹⁵⁴. l: White y col. ¹⁴⁵. m: Delbue y col. ¹⁵⁵.

Estos datos se han interpretado como que en algunos pacientes la enfermedad desmielinizante puede desarrollarse después de una infección primaria, más bien que requerir un periodo de latencia. La hipótesis arquetípica ha sido ampliamente aceptada, de hecho, la enfermedad puede ocurrir debido a la transformación de la variante arquetípica a la neurotrópica. Sin embargo, existe al menos una posibilidad alternativa, por ejemplo que el virus neurotrópico también circule en la población humana sana y que además pueda causar la enfermedad desmielinizante en la infección primaria (figura 15).

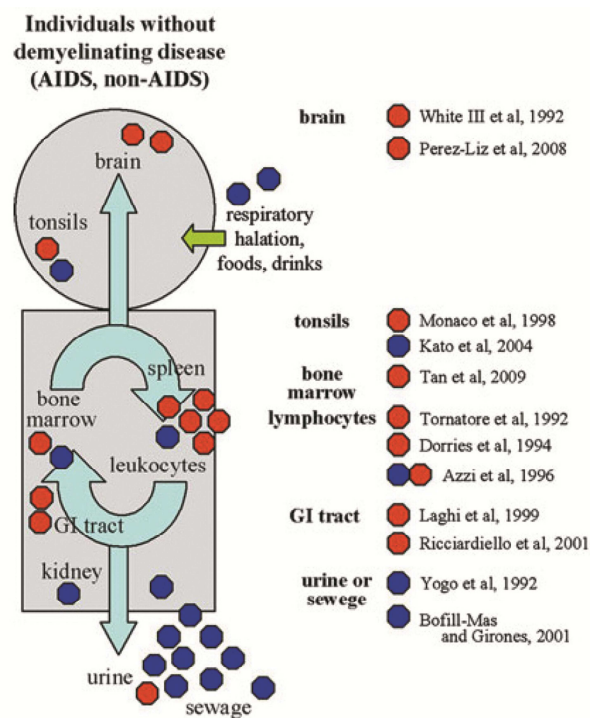


Figura 15. Detección de la variante arquetípica y neurotrópica en múltiples tejidos de individuos portadores, cuestionando la hipótesis arquetípica (figura adaptada de Shishido-Hara y col. ⁹⁶). En rojo: White y col., 1992 ¹⁴⁵; Perez-Liz y col., 2008 ¹⁴⁴; Monaco y col., 1998 ¹³⁵; Tan y col., 2009 ¹⁴¹; Tornatores y col., 1992 ¹³¹; Dorries y col., 1994 ¹³⁹; Azzi y col., 1996 ¹⁴⁰; Laghi y col., 1999 ¹³⁸; Ricciardiello y col., 2001 ¹³⁷. En azul: Kato y col., 2004 ¹³⁶; Azzi y col., 1996 ¹⁴⁰; Yogo y col., 1992 ¹⁰³; Boffill-Mas y Girones, 2001 ¹³⁴.

En ciertos casos concretos, como en los pacientes de EM tratados con natalizumab, existen otros factores a tener en cuenta que podrían intervenir en todo este proceso de reactivación viral. El natalizumab, además de bloquear la extravasación de los leucocitos hacia el SNC también provoca un aumento de las células hematopoyéticas CD34+ tanto en sangre como en médula espinal ¹⁵⁶ e incrementa la circulación de células B y pre-B en la periferia ya que, además, impide que las CD34+ regresen a la médula espinal y que las células pre-B se dirijan a las zonas marginales de los nódulos linfáticos ^{74,157}. Puesto que el virus JC ha sido detectado tanto en CD34+ como en

células pre-B ¹⁵⁸ este fármaco provocaría un ambiente favorable para que el virus JC se comenzara a replicar en el torrente circulatorio e infectara otros órganos diana.

4.6 Transactivación viral

Como hemos visto con anterioridad, uno de los reservorios del virus JC es la médula espinal, en la que el virus podría infectar tanto a células CD34+ como a pre-B. Sin embargo, el virus JC no es el único que infecta células del sistema inmune, muchos otros han sido descritos: el citomegalovirus humano (CMV), el HHV-6, el EBV, etc. Más concretamente el CMV utiliza las CD34+ como sitio de latencia ¹⁵⁹, y lo que es más, según ciertos trabajos puede transactivar el virus JC ¹⁶⁰. Ambos virus pueden ser modulados por el VIH, que a su vez se ha propuesto que infecta y establece latencia en los reservorios de células CD34+. Además, los tres virus son activados por factores implicados en la diferenciación de células B o por el mismo proceso de diferenciación, pareciendo probable que exista un fenómeno de interacción entre todos ellos ¹¹¹.

Por otro lado, otro trabajo publicado apunta a la transactivación del virus JC por el HHV-6, pues describe como la superinfección con HHV-6 de células de glía infectadas con virus JC aumenta la expresión del virus JC ¹⁶¹.

Esta interacción del virus JC con otros virus que pueden infectar el sistema inmune y el cerebro es un área que requiere de estudios más profundos, ya que la coinfección de ciertos virus podría ser un factor más de riesgo para el desarrollo de la LMP.

4.7 Métodos para detectar el virus JC

4.7.1 DETECCIÓN DEL ADN VIRAL EN SANGRE, SUERO, PLASMA, LCR MEDIANTE qPCR.

Son varios los grupos que han estudiado la presencia del virus JC en sangre, suero, orina y/o LCR mediante qPCR (PCR a tiempo real o cuantitativa) con el fin de saber si podría ser un posible factor a tener en cuenta para la estratificación del riesgo de LMP y de aumentar nuestro conocimiento en materias tales como: posible aumento de la reactivación del virus JC a lo largo de tratamiento con natalizumab, aumento de la carga

viral en lugares de latencia del virus, etc. Sin embargo, cada grupo utiliza distintos métodos de extracción del ADN de las muestras, distintos *primers* y condiciones de amplificación. Esto tiene como consecuencia distintos límites de detección de la técnica y la consecuente disparidad de resultados en estudios con pacientes de las mismas características (tabla 6).

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos en las publicaciones más recientes en las que se cuantifica el virus JC en enfermos de esclerosis múltiple en sangre, suero, orina y/o LCR.

Artículo	Nº participantes (A) <i>primers</i> (B) Límite de detección (C)	Muestra: detección ADN del JCV
Rinaldi y col. ¹⁹⁰	(A) 42 pacientes 18 meses con natalizumab (B) Nd (C) 42 copias/ml	<u>Plasma</u> : pacientes en los que se detecta el virus JCV en VB: ninguno, en V6: un paciente, en V13: otro paciente, en V12 y V13 (de forma permanente): otro paciente <u>Orina</u> : no diferencia significativa de la prevalencia entre VB (26%) y V12 (31%) V18(16%)
Rudick y col. ¹⁸⁶	(A) 224 pacientes 12 meses con natalizumab 1024 pacientes 12 meses con natalizumab 1397 pacientes 22 meses con natalizumab 5 pacientes desarrollaron LMP (B y C) VIRACOR (<i>primers</i> ensayo comercial): 50 copias/ml NIH (<i>primers</i> para Antígeno T, Ryschkewitsch y col.): 10 copias/ml	<u>Sangre</u> : No se detecta ADN viral <u>Plasma</u> (VIRACOR): 0,4% de positivos, 6 de 1397 analizados. <u>Suero</u> (NIH): 19% de positivos <u>Orina</u> : prevalencia de JCV entre VB y V12 son similares, de un 25% <u>Sangre y suero de LMP</u> : no se detectó ADN de JCV en ningún momento antes del comienzo de los síntomas de la LMP
Jilek y col. ¹⁸⁷	(A) 24 pacientes tratados con natalizumab durante 18 meses (B) <i>Primers</i> para Antígeno T ¹⁶⁷ (C) Sangre : 10 copias/μg Orina y plasma : 500 copias/ml	<u>Sangre</u> : No se detectó JCV <u>Plasma</u> : No se detectó JCV <u>Orina</u> : la concentración de ADN permaneció estable
Sadiq y col. ¹⁹¹	(A) 200 pacientes con natalizumab (B) <i>Primers</i> para Antígeno T (C) 500 copias/ml	<u>Plasma</u> : en V6 hay 1 positivo <u>LCR</u> : dos pacientes positivos uno en V4 y otro en V18 no LMP

JCV: virus JC; N.d.: no disponibles.

2.7.2 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-JC

Se han publicado muchos trabajos acerca de la seroepidemiología del virus JC. Uno de los más antiguos revela la distribución ubicua del virus JC, demostrando la presencia de anticuerpos anti-JC en un 50%-60% de la población adulta estudiada con una edad comprendida entre los 20-50 años¹⁶². Sin embargo, con posterioridad, las tasas de

seroprevalencia publicadas varían entre el 39% y el 91% ¹⁶³⁻¹⁶⁷ según el trabajo consultado, como podemos ver en la tabla 7.

Tabla 7. Artículos publicados recientemente de seroprevalencia de anticuerpos dirigidos contra el virus JC

Artículo	(A) N° participantes (B) Técnica para detectar anticuerpos anti-JCV	Resultados
Egli y col. ¹⁸⁵	(A) 400 donantes de sangre sanos de edades comprendidas entre los 20-59 años (B) EIA	Seroprevalencia de las IgG anti-JCV: 58%. Grupo de jóvenes (20-29 años): 50%. Mayores (50-59 años): 68% (p=0,06) Las cargas virales del JCV en orina se correlacionaron positivamente con niveles de IgG
Kean y col. ¹⁶³	(A) 1501 donantes de sangre sanos (B) ELISA con proteínas de la cápside VP1 recombinantes	Seroprevalencia de las IgG anti-JCV: 39%
Grabowski y col. ¹⁶⁴	(A) 28 casos de LMP frente a 26 controles VIH+ y 50 controles VIH- ambos sin LMP (B) ELISA con proteínas de la cápside VP1 recombinantes	Seroprevalencia de las IgG anti-JCV en los casos: 85%, en controles VIH+: 79% y en controles VIH-: 72% En los casos los sueros se recolectaron entre 5 meses y 8 años antes de LMP, entre ellos un caso seronegativo 5 meses antes del diagnóstico de la LMP
Antonsson y col. ¹⁶⁵	(A) 458 adultos que participan en un estudio longitudinal de cáncer de piel en Queensland (Australia) (B) GST-capture ELISA	Seroprevalencia de las IgG anti-JCV en personas < 50 años: 60%, 50-70 años: 68% y en > 70 años: 70%. Población que seroconvirtió, serorevertió o tuvo unos niveles fluctuantes de anticuerpos anti-JC: 4%
Matos y col. ¹⁶⁶	(A) 78 individuos sanos y 63 pacientes con VIH procedentes de una población portuguesa (B) EIA	Seroprevalencia de las IgG anti-JCV en un 91% de la población estudiada, independientemente de la infección con VIH. Se demostró una correlación positiva entre los niveles de anti-JC y las cargas virales del JCV en orina.
Ryschke-witsch ¹⁶⁷	(A) 35 pacientes con esclerosis múltiple tratados con natalizumab que desarrollaron LMP (B) ELISA	Seroprevalencia de las IgG anti-JCV: 71,4% En la mayoría de muestras se apreció un aumento elevado o moderado de los niveles de anticuerpos desde el momento del diagnóstico de la LMP. El plasma de un paciente cercano al momento de diagnóstico de la LMP tuvo un título considerado seronegativo y otros dos como seropositivo pero en la línea basal.

EIA: inmunoensayo enzimático; ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima; JCV: virus JC; VIH+: VIH positivos; VIH-: VIH negativos.

Las diferencias de tamaño muestral, demográficas y, quizás más importante, metodológicas entre los distintos estudios sean probablemente la causa de la discrepancia entre estas seroprevalencias publicadas a lo largo del tiempo. Por ello, recientemente, Gorelik y col. han desarrollado un doble ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus JC en plasma y suero de pacientes de EM que están siendo tratados con natalizumab ⁵⁸. Además, se ha descrito que el porcentaje de la población con

anticuerpos anti-JC parece aumentar con la edad, y puede variar entre regiones geográficas ¹⁶⁸.

Sin embargo, a pesar de que los seres humanos poseamos anticuerpos anti-JC, la significación clínica de estos anticuerpos se desconoce. Los niveles de anticuerpos aumentarían durante la infección activa, alcanzando títulos muy elevados, pero sin ofrecer ningún tipo de protección.

4.8 Respuesta del sistema inmune frente al virus JC

Principalmente, la respuesta inmune frente a una infección viral está mediada por los linfocitos T CD8+. Estas células eliminan las células infectadas por virus mediante el reconocimiento de los epítomos virales presentados por las glicoproteínas de HLA clase I, que están presentes en la mayor parte de las células nucleadas. Como se puede apreciar en la figura 16, cuando una nueva proteína viral se sintetiza (a) es marcada para ser destruida en el citoplasma de la célula infectada y degradada en péptidos por el proteosoma (b). Los péptidos son entonces transportados al retículo endoplasmático donde se encontrarán con el heterodímero de HLA clase I (c) y se unirán a su hendidura (d). El complejo migrará por el aparato de Golgi hacia la superficie celular donde será reconocido por el TCR (receptor de células T) de los linfocitos CD8+ (e). Sin embargo, los linfocitos CD4+, cuyo papel fundamental es estimular a los macrófagos y CD8+ (respuesta *T helper 1*) o a las células B (*T helper 2*) produciendo citoquinas, reconocen epítomos virales presentados por las moléculas de HLA clase II, que sólo se expresan en las células presentadoras de antígeno. Éstas incluyen macrófagos, células B y dendríticas que internalizan antígenos extraños por endocitosis (A). Estos antígenos son degradados a péptidos por proteasas (B). Las glicoproteínas de clase II sintetizadas en el retículo endoplasmático (C) se modifican durante su migración por el aparato de Golgi y las vacuolas de clase II se fusionan con el endosoma que contiene los péptidos (D). Una vez se produzca la unión del antígeno patógeno a la molécula de HLA clase II, el complejo maduro se dirigirá a la superficie celular donde será reconocido por el TCR de los linfocitos T CD4+ (E). Las células CD4+ proliferarán y producirán citoquinas ¹⁶⁹.

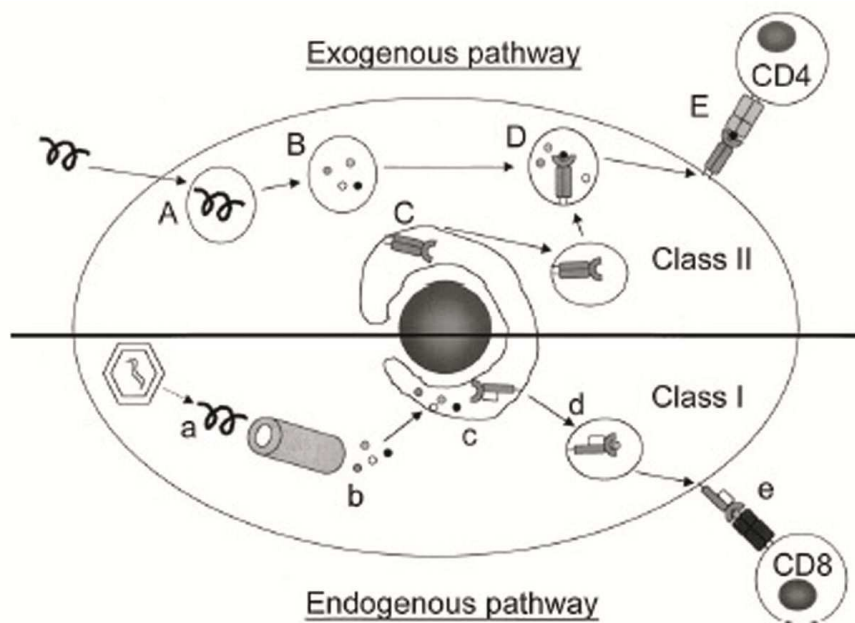


Figura 16. Vías exógena y endógena del procesamiento de antígeno. Se representan las vías de presentación antigénica clase II (A-E) y clase I (a-e) (figura extraída de Koralnik y col. ¹⁶⁹).

En el caso concreto del virus JC, aquellos pacientes de LMP asociada a VIH con una respuesta de células CD8+ antígenoespecífica en la cual el antígeno es presentado con la molécula de HLA clase I codificada por el alelo HLA-A*0201, muestran correlación con un buen pronóstico de la LMP ^{170,171}. También, muchos trabajos también demuestran la gran importancia de las células CD4+ para un buen control de la enfermedad ¹⁷²⁻¹⁷⁶. Es más, el reconocimiento de antígenos virales extracelulares presentados por el MHC-II a las células CD4+ y la consecuente activación de las células citotóxicas CD-8+ parece ser importante en el control de las células infectadas por el virus JC ^{169,175}, frente a la existencia de una respuesta humoral ineficaz ¹⁷⁷.

Así, factores de riesgo de padecer LMP incluirían un aumento del título de anticuerpos anti-JC y una respuesta de las células T (CD4+ y CD8+) inefectiva ¹⁶⁸.

II HIPÓTESIS

Varios factores podrían estar implicados en el desarrollo de la LMP en pacientes de EM tratados con natalizumab:

- El aumento de la reactivación del virus JC o de su carga viral a lo largo de tratamiento con natalizumab, siendo determinante la técnica utilizada para la detección viral.
- La respuesta inmune específica de cada paciente frente a la reactivación del virus JC.
- La existencia de una posible transactivación del virus JC por HHV-6.
- La detección de la variante neurotrópica patogénica durante el tratamiento con el anticuerpo monoclonal.

III OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

1. Estudio de la reactivación del virus JC en pacientes de EM durante el tratamiento con natalizumab mediante la detección de su ADN por qPCR en muestras de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica), suero y orina.
2. Determinación del grado de concordancia entre los resultados obtenidos con las dos técnicas empleadas para la determinación de aquellos pacientes que están o han estado en contacto con el virus JC: doble-ELISA y qPCR.
3. Análisis de la posible asociación entre el HLA clase II y la presencia del virus JC en PBMCs, suero y orina durante el tratamiento con natalizumab.
4. Estudio de la hipotética transactivación del virus JC por parte del HHV-6 a lo largo del tratamiento con el anticuerpo monoclonal.
5. Determinación de los tipos de variantes del virus JC, neurotrópicas o arquetípicas, presentes en PBMCs, suero, orina y LCR a lo largo del tratamiento con natalizumab en tres pacientes de EM, dos de los cuales desarrollaron LMP.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE PACIENTES

En este trabajo se incluyeron 189 pacientes diagnosticados de EM según los criterios de Posser ³ o McDonald ⁴ en la Unidad de EM del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos ellos tratados o susceptibles de ser tratados con natalizumab desde octubre de 2007 hasta junio de 2012. Dichos pacientes accedieron a la participación en los distintos estudios aquí presentados mediante la firma de los correspondientes consentimientos informados, aprobados previamente por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Se excluyeron de este trabajo a aquellos pacientes que no siguieron adecuadamente el tratamiento con natalizumab; es decir, que no recibieron mensualmente una infusión de 300 mg del fármaco por vía intravenosa. También fueron excluidos aquellos pacientes que desarrollaron algún tipo de reacción adversa, tipo de hipersensibilidad al fármaco. Estas reacciones alérgicas son causa de la retirada inmediata del mismo, y suelen tener lugar al inicio del tratamiento. Aquellas pacientes que interrumpieron el tratamiento, una o varias veces, por embarazo o intención del mismo y que luego lo retomaron, fueron incluidas en los estudios hasta la primera interrupción.

2. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

Con el fin de alcanzar los objetivos planteados en este trabajo, los pacientes fueron agrupados en distintos estudios que pasaremos a desarrollar a continuación, de tal forma que ciertos pacientes participaron en varios de ellos. La distribución de los pacientes en cada estudio se detalla en la figura 17.

2.1 Estudio de la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab (qPCR)

Cien de los 189 pacientes de EM participaron en un estudio observacional de cohortes abierto, en el que se valoró los niveles de ADN del virus JC mediante qPCR en PBMCs, suero y orina en una primera visita basal (VB, en la que los pacientes no tenían tratamiento), y a partir de ésta cada tres meses sucesivamente una vez iniciado el tratamiento con natalizumab, hasta que finalizó el estudio o este tratamiento fue sustituido por otro. Dichos pacientes fueron tratados con el anticuerpo monoclonal un mínimo de 6 meses, y la última visita tenida en cuenta en el estudio en el caso de que el tratamiento no fuera interrumpido fue de 39 meses, dado que sólo 17 pacientes tenían datos para periodos de tratamiento más largos. Todos aquellos pacientes que carecieron de muestra de PBMCs, suero y orina en la VB no se tuvieron en cuenta en este estudio. Las características clínicas de esta población pueden consultarse en la tabla 8.

Tabla 8. Características clínicas de los individuos que participaron en el estudio de la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab (qPCR).

	Reactivación virus JC	
	NTZ n=100	controles sanos n=263
Sexo M:H (%:%)	68:32 (68:32)	176:87 (66,9:33,1)
Edad Io NTZ, a	37,1 ± 7,2 (22, 59)	38,3 ± 8,6 (19, 69)
Duración EM Io NTZ, a	7 (4,5, 11)	-
Duración de NTZ, m	27 (12, 39)	-
Brotes 2 a antes Io NTZ	2 (2, 4)	-
EDSS al Io NTZ	3,5 (2, 4)	-
Tratamiento previo NTZ		
IMM, AG o ambos (%)	94 (94)	-
Nº de TT diferentes	1,4 ± 0,7 (0, 4)	-
duración, m	25 (13, 51)	-
Sin TT (%)	6 (6)	-

A: años; AG: acetato de glatiramerio; EDSS: escala expandida del estado de discapacidad; edad Io NTZ: edad al inicio del tratamiento con natalizumab; EM: esclerosis múltiple; INM: inmunomoduladores; m: meses; M:H: mujer:hombre; TT: tratamiento.

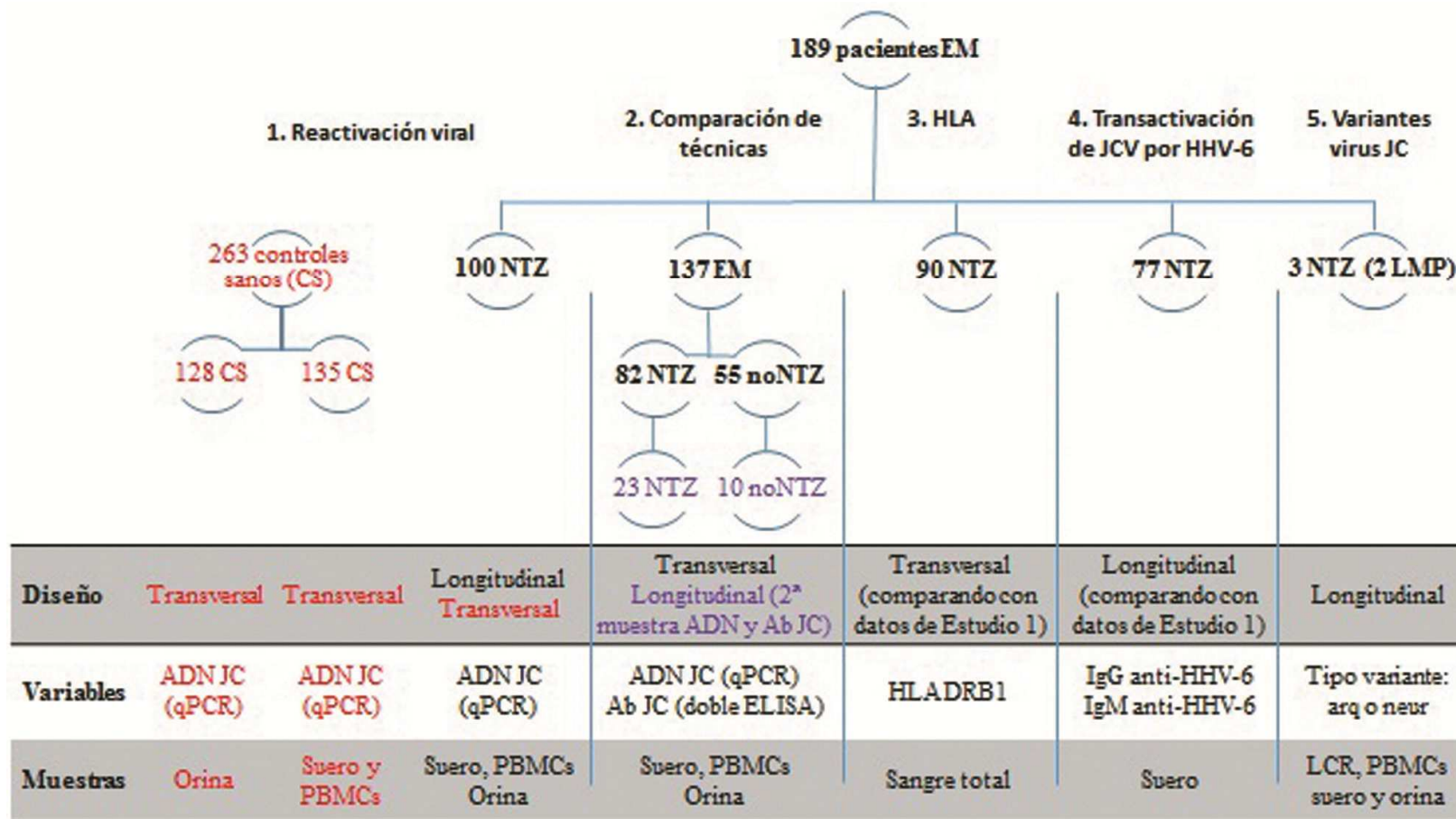


Figura 17. Diseño de los distintos estudios planteados en este estudio. 1. Reactivación viral: estudio de la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab (qPCR); 2. Comparación de técnicas: qPCR vs doble ELISA; 3. HLA: asociación entre tipo de HLA clase II y reactivación viral. Ab JC: anticuerpos anti-JC; arq: arquétipica; LCR: líquido cefalorraquídeo; neur: neurotrópica; PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

Además, se recopiló una sola muestra de orina de 128 controles sanos y otra de PBMCs y de suero de otros 135 controles sanos (en rojo en la figura 17). En estas muestras se evaluaron los niveles de ADN viral mediante la misma qPCR comparados con los de la VB del estudio longitudinal presentado anteriormente (detección del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab). Estas muestras se obtuvieron de donantes de sangre y empleados del Hospital Clínico San Carlos de Madrid que dieron su consentimiento informado para participar en este estudio. Todos estos controles están ajustados a los casos por sexo y edad.

2.2 Estudio comparativo de técnicas de detección del virus JC (doble ELISA vs qPCR)

Con el fin de identificar a los pacientes en contacto previo con el virus JC mediante doble ELISA y qPCR se diseñó un estudio observacional transversal en el que participaron 82 pacientes de EM tratados con natalizumab y otros 55 no tratados o tratados con otros fármacos (IFNs o AG) (tabla 9).

Tabla 9. Características clínicas de los individuos que participaron en el estudio comparativo de técnicas de detección del virus JC (doble ELISA vs qPCR).

	doble ELISA vs qPCR	
	NTZ n=82	No-NTZ n=55
Sexo M:H (%:%)	54:28 (66:34)	40:15 (73:27)
Edad en el momento de muestra, a	38,8 ± 7,4 (24, 59)	37,7 ± 8 (20, 63)
Duración EM, a	9 (6, 13)	8 (3, 14)
Duración del TT actual en el momento de muestra, m	20 (11,8, 28)	26 (13, 47)
Brotos		
2 a antes de TT actual	3 (2, 4)	2 (1, 3)
Durante el TT actual	0 (0, 0,5)	0,5 (0, 1,27)
EDSS		
Antes de comenzar el TT actual	3,2 ± 1,4 (0, 6,5)	1,64 ± 1,5 (0, 6)
Durante el TT actual	3,1 ± 1,5 (0, 7)	2,8 ± 1,4 (0, 5)
Tratamiento previo al TT con NTZ		
IMM, AG o ambos (%)	79 (96,3)	-
Nº de TT diferentes	1,4 ± 0,7 (0, 4)	-
duración, m	23 (14, 49,5)	-
Sin TT (%)	3 (3,7)	-

A: años; AG: acetato de glatiramero; EDSS: escala expandida del estado de discapacidad; NTZ: natalizumab; EM: esclerosis múltiple; INM: inmunomoduladores; m: meses; M:H: mujer:hombre; TT: tratamiento.

En ellos evaluamos simultáneamente la presencia de anticuerpos anti-JC en suero (mediante doble ELISA, excepto en 10 pacientes no natalizumab en los que se empleó doble ELISA de 2ª generación) y los niveles de ADN del virus JC en PBMCs, suero y orina (mediante qPCR). Además, valoramos el efecto de los siguientes parámetros demográficos y clínicos sobre las previamente citadas variables de laboratorio: sexo, edad, tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la EM hasta la extracción de las muestras para la detección de anticuerpos anti-JC y los niveles de ADN viral, tratamiento previo a natalizumab y duración del mismo hasta la extracción de las muestras y número de meses de tratamiento con el fármaco.

Por otro lado, 23 de los 82 pacientes tratados con natalizumab y 10 de los no tratados se sometieron a un segundo análisis de anticuerpos anti-JC, puesto que fueron negativos en el primero. Todas estas segundas muestras de pacientes fueron analizadas con el doble ELISA de 2ª generación, tras 11.8 ± 0.6 y 10.8 ± 1.4 meses respectivamente desde que la primera muestra fue enviada a analizar. Todos los pacientes que pertenecían al grupo de los no tratados en la primera medición pasaron al de tratados en la segunda, ya que comenzaron con el tratamiento con natalizumab dado su estatus negativo para anticuerpos anti-JC.

Entre estos 33 pacientes con una segunda detección de anticuerpos anti-JC 23 también participaron en el estudio de la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab.

2.3 Estudio de la posible asociación entre el HLA clase II y la reactivación del virus JC durante el tratamiento con natalizumab

Se procedió al tipaje del *HLA-DRB1* en 90 pacientes de EM de los 189 totales, de los cuales también teníamos datos de la reactivación del virus JC durante el tratamiento con natalizumab (detección del virus JC en PBMCs, suero y orina a lo largo del tratamiento con natalizumab). En la tabla 10 se presentan las características clínicas de los pacientes que participaron en este estudio.

Tabla 10. Características clínicas de los individuos que participaron en el estudio de la posible asociación entre el HLA clase II y la reactivación del virus JC durante el tratamiento con natalizumab.

	HLA NTZ=90
Sexo M:H (%:%)	61:29 (67,8:32,2)
Edad Io NTZ, a	37,1 ± 7,2 (22, 59)
Duración EM Io NTZ, a	7 (4,5, 11)
Duración de NTZ, m	27 (12, 39)
Brotos 2 a antes Io NTZ	3 (2, 4)
EDSS al Io NTZ	3,5 (2, 4,5)
Tratamiento previo NTZ	
<i>IMM, AG o ambos (%)</i>	84 (93,3)
Nº de TT diferentes	1,4 ± 0,7 (0, 4)
duración, m	24,5 (13, 50,3)
<i>Sin TT (%)</i>	6 (6,7)

A: años; AG: acetato de glatiramero; EDSS: escala expandida del estado de discapacidad; edad Io NTZ: edad al inicio del tratamiento con natalizumab; EM: esclerosis múltiple; INM: inmunomoduladores; m: meses; M:H: mujer:hombre; TT: tratamiento.

2.4 Estudio de la posible transactivación del virus JC por el HHV-6 durante el tratamiento con natalizumab

Evaluamos semestralmente los niveles de IgG y/o IgM contra el HHV-6 (ELISA, Panbio) en el suero de 77 de los 189 pacientes de EM iniciales que participaron en los diversos estudios, desde una primera VB hasta V24 en el caso de que fuera posible. Se descartaron del estudio todos aquellos pacientes sin muestra de suero para analizar en la VB o que no llevaran al menos 6 meses de tratamiento (tabla 11). Además, estos 77 pacientes también participaron en el estudio de la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab.

Tabla 11. Características clínicas de los individuos que participaron en el estudio de la posible transactivación del virus JC por el HHV-6 durante el tratamiento con natalizumab.

	Transactivación del virus JC por HHV-6 NTZ n=77
Sexo M:H (%:%)	50:27 (64,9:35,1)
Edad Io NTZ, a	36,5 ± 6,6 (32, 41)
Duración EM Io NTZ, a	7 (5, 11)
Duración de NTZ, m	33 (24, 39)
Brotos 2 a antes Io NTZ	2 (2, 4)
EDSS al Io NTZ	3,5 (2, 4,1)
Tratamiento previo NTZ	
<i>IMM, AG o ambos (%)</i>	71 (92,2)
Nº de TT diferentes	1,4 ± 0,7 (0, 4)
duración, m	24 (15, 54)
<i>Sin TT (%)</i>	6 (7,8)

A: años; AG: acetato de glatiramero; EDSS: escala expandida del estado de discapacidad; edad Io NTZ: edad al inicio del tratamiento con natalizumab; EM: esclerosis múltiple; INM: inmunomoduladores; m: meses; M:H: mujer:hombre; TT: tratamiento.

2.5 Estudios de las variantes del virus JC en pacientes con LMP

En este estudio se presentan detalladamente las cargas virales de virus JC en PBMCs, suero y orina de tres pacientes (P56, P89 y P1004) de los 189 de EM iniciales en una primera VB, trimestralmente a lo largo del tratamiento con natalizumab, y tras la interrupción del mismo y el comienzo con acetato de glatiramero. Los pacientes P1004 y P89 desarrollaron ambos LMP tras 24 y 47 meses de tratamiento con natalizumab respectivamente; mientras que en P56 hubo sospecha debido a la detección mantenida en el tiempo del virus JC mediante qPCR en PBMCs, pero no llegó a confirmarse ni por RM ni por detección del ADN viral en LCR tras 24 meses con natalizumab. Se añaden los datos de las cargas virales de estos 3 pacientes en LCR cuando se procedió a una punción lumbar para la posible confirmación y posterior seguimiento de la LMP.

Por otra parte, el ADN de la RR del virus JC de las muestras seleccionadas en la tabla 12 de estos 3 pacientes fue clonado y secuenciado para estudiar las variantes virales: arqueótípicas o neurotrópicas.

Tabla 12. Muestras que se incluyen en estudio de las variantes del virus JC en pacientes con LMP.

P56 (NO LMP)	P1004 (LMP a 2 años)	P89 (LMP a 4 años)
VB: Orina	VB: Orina	VB: Orina
V12: Orina	V12: Orina	
V24: PBMCs, suero y orina	V24=LMP: LCR, PBMCs, suero y orina	-
-	LMP+15d: LCR, PBMCs, suero y orina	-
-	-	V45: PBMCs, suero y orina
-	-	V47=LMP: LCR y orina
-	-	LMP+22d: PBMCs, suero y orina
-	-	LMP+1m15d: LCR, PBMCs, suero y orina

D: días; LCR: líquido cefalorraquídeo; LMP: leucoencefalopatía multifocal progresiva; m: meses; P56: paciente número 56; VB: visita basal sin tratamiento; V12: visita tras 12 meses con natalizumab; PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

3. ANÁLISIS DE MUESTRAS

3.1 Extracción de ADN de PBMCs, suero, orina y LCR

Las PBMCs se recogieron después de centrifugar aproximadamente 8 ml de sangre total en tubos CPT (Becton Dickinson, NJ, USA) a 2.500 g durante 30 minutos. El ADN de estas células fue extraído siguiendo las instrucciones de la casa comercial del kit *QIAamp ADN Blood Mini* (QIAGEN, Hilden, Germany).

El suero se obtuvo tras la centrifugación de unos 5 ml de sangre total en tubo seco a 2.500 g durante 14 minutos. Posteriormente se ultracentrifugó 1 ml de este suero a 350.000 g durante 15 minutos a 8°C; el ADN del precipitado correspondiente fue extraído siguiendo el protocolo del fabricante del kit *QIAamp Viral RNA Mini* (QIAGEN, Hilden, Germany).

El LCR fue recogido en tubo seco tras la punción lumbar, y 1 ml del mismo fue ultracentrifugado a 350.000 g durante 15 minutos a 8°C. A continuación, se extrajo el ADN del precipitado con el kit *QIAamp Viral RNA Mini* (QIAGEN, Hilden, Germany).

La orina se recolectó en tubos estériles y, posteriormente, el ADN fue extraído siguiendo las recomendaciones de la casa comercial del kit *QIAamp Ultrasense Virus* (QIAGEN, Hilden, Germany).

Durante el proceso de extracción de ADN, por cada grupo de 15 muestras se introdujo 1 blanco (mezcla de reacción y PBS) con el fin de evaluar la existencia de una posible contaminación entre muestras. Todas estas muestras fueron alicuotadas y posteriormente almacenadas a -80°C hasta su procesamiento y/o posterior análisis.

La cuantificación de ADN extraído de PBMCs se llevó a cabo por espectrofotometría ($\lambda=260$ nm) (BioPhotometer, Eppendorf) valorando la pureza del mismo ($A_{260/280}$), siempre mayor de 1,7, y permitiendo ajustar la concentración a 40 ng/ μ l con el eluyente de la extracción. Esta cuantificación de ADN se realizó teniendo en cuenta que una unidad de DO (densidad óptica) se corresponde con 50 ng/ μ l. Sin embargo, no pudo llevarse a cabo en el ADN extraído de suero, orina y LCR, ya que se utiliza un *carrier* de ARN durante el proceso de extracción que interferiría en la correcta cuantificación del ADN.

3.2 Detección de ADN del virus JC mediante qPCR

Comenzaremos comentando brevemente en que consiste la qPCR (figura 18).

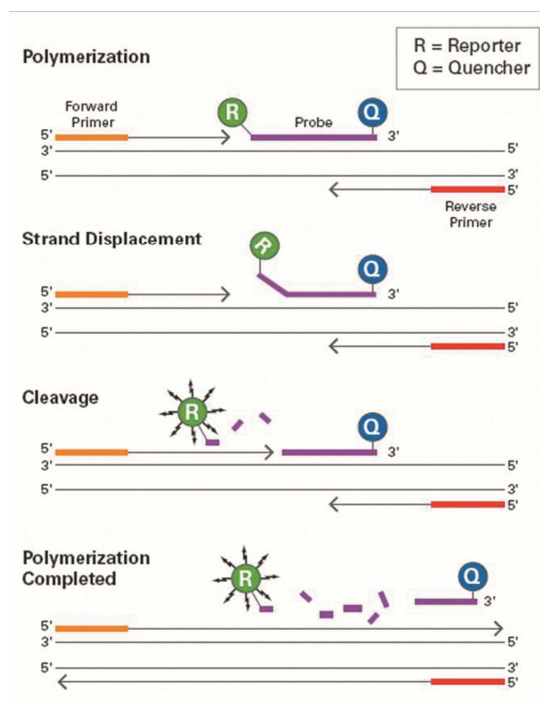


Figura 18. Diagrama de una qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, o a tiempo real).

En cada reacción se utiliza un único juego de *primers* o iniciadores con sonda TaqMan marcada específicamente, y que es complementaria a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente (*reporter*) en el extremo 5' y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3', de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del *quencher* y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. El número de copias absoluto de genoma viral originario en cada muestra se determina valorando los niveles de fluorescencia de cada muestra de reacción, comparado con los de la curva estándar generada a partir del número de copias conocidas del control positivo del genoma viral.

Acerca de la qPCR llevada a cabo en este estudio para la detección y cuantificación del ADN extraído previamente de nuestras muestras, especificar que se realizó siguiendo

las condiciones previamente descritas por Watzinger y col.¹⁷⁸, utilizando un termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research. Sydney. Australia) y una Master Mix (2x) (AmpliTaQ Gold® 360 Master Mix, Applied biosystems™). Con esta técnica se amplificó el gen de ARNm tardío, siendo el límite de detección en PBMCs 4 copias/μg, en suero y LCR 17 copias/ml y en orina 14 copias/ml. La estimación final del número de copias de ADN se llevó a cabo mediante una recta patrón con cantidades conocidas (50000, 5000, 500, 50 y 5 copias) de genoma de viriones de JC (ABI. Advanced Biotechnologies Inc., Columbia, USA), analizando cada punto de la curva por triplicado.

En cada qPCR se amplificaron 2 controles negativos, con todos los componentes de la mezcla de reacción excepto el ADN que se substituyó por agua libre de nucleasas (DEPC-treated water, Ambion). En uno de ellos el agua se deposita antes de dispensar las muestras de ADN, para comprobar la existencia de contaminación en alguno de los reactivos, y en el otro cuando se han añadido la mitad de las muestras, con el fin de poder detectar posibles contaminaciones cruzadas entre dichas muestras. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. En el caso de que sólo un duplicado fuera detectado se llevó a cabo otra qPCR con otros dos duplicados de esta misma muestra, considerándola positiva sólo en el caso de que al menos uno de estos últimos duplicados fuera detectado. El valor de la carga viral final se obtuvo calculando el valor medio de las cargas virales de todos los duplicados y haciendo uso del software GenEx.

3.3 GENOTIPADO DEL HLA clase II

3.3.1 GENOTIPADO HLA

El tipaje del locus *HLA-DRB1* se llevó a cabo mediante la técnica PCR-SSOP (*Polymerrase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotid Probe*). Lo que implica la amplificación mediante PCR del segundo exón de cada uno de estos genes por ser en ellos donde se concentran los polimorfismos que distinguen los alelos. A continuación, el producto es transferido a una membrana de nitrocelulosa mediante la técnica de Dot-Blot. Posteriormente, los productos transferidos se hibridan con sondas oligonucleotídicas específicas de alelo marcadas con digoxigenina para proceder al revelado (por quimioluminiscencia) y finalmente a la interpretación de los resultados.

3.3.2 GENOTIPADO DEL ALELO *DRB1*15:01*

La presencia del principal alelo de susceptibilidad para EM, el alelo *DRB1*15:01*, fue determinada mediante el genotipado del SNP rs3135388. Este SNP presenta una correlación mayor del 0,94 con el alelo *DRB1*15:01*, y para tiparlo utilizamos un ensayo TaqMan ya validado con anterioridad^{179,180}. Esta técnica se empleó en aquellos individuos en que el tipaje PCR-SSOP indicaba existencia del alelo *HLA-DRB1*02*.

En todos estos ensayos Taqman, se utiliza una MasterMix común [enzima DNA polimerasa (*Taq Gold*), buffer, nucleótidos, MgCl₂ y amperasa (para degradar cualquier amplicón inespecífico)] y los *primers* y sondas específicos de cada SNP de estudio. Las sondas se marcan en su extremo 5' con un fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) o VIC (4, 7, 2', 4', 5', 7',-hexacloro-6-carboxifluoresceína), y en su extremo 3' presentan un *quencher*. Esta técnica está basada en una qPCR, de tal forma que dependiendo del fluoróforo que emita la señal sabremos que alelo/s están presentes en cada muestra. El equipo utilizado para este tipo de ensayos fue el ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con las siguientes condiciones de PCR: a) 2 minutos a 50°C (amperasa activada) b) 10 minutos a 95°C (polimerasa activada) y c) 40 ciclos: 15 segundos a 92°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (hibridación y elongación).

3.4 Detección de anticuerpos anti-JC mediante doble ELISA

Para detectar los anticuerpos anti-JC se envió una muestra de sangre de los pacientes de interés al laboratorio de referencia (Unilabs, Dinamarca), donde se lleva a cabo el test STRATIFY JCV™ (doble ELISA), descrito previamente por Gorelik y col.⁵⁸ o el STRATIFY JCV™ DxSelect™ (doble ELISA de 2ª generación).

La técnica de doble ELISA se llevó a cabo como describió previamente el grupo de Gorelik⁵⁸.

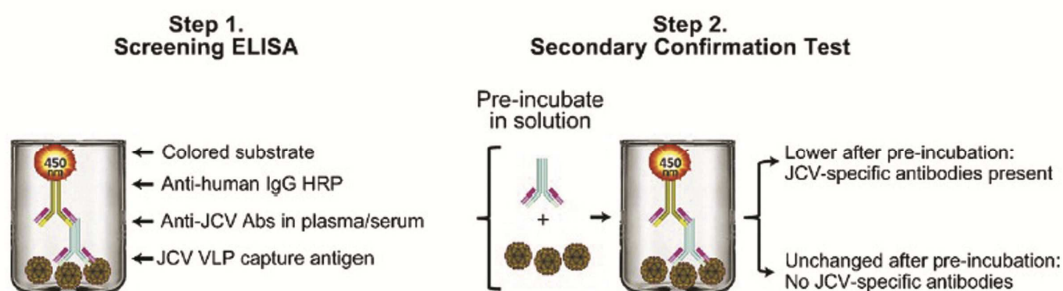


Figura 19. Doble ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) para detectar anticuerpos anti-JC. Abs: anticuerpos, H+L: cadena pesada y ligera; HRP: peroxidasa de rábano, IgG: inmunoglobulina G; JCV: virus JC; VLPs: partículas similares a virus (figura extraída de Plavina y col. ¹⁸¹).

Más concretamente, en este ensayo se utilizaron partículas similares a virus JC (VLP) expresadas en baculovirus que contenían la proteína de la cápside VP1 de la variedad Mad-1 y tres niveles de muestras de control de calidad (CC) (control muy positivo (CP1), poco positivo (CP2) y un control negativo (CN)) obtenidos de un conjunto de sueros humanos sanos. En el ELISA de *screening* (primer ELISA), las VLP del virus JC se inmovilizaron en las placas de microtitulación. Las muestras del CC se diluyeron y las muestras de suero o plasma de los pacientes se añadieron a la placa e incubaron. A continuación, se lavaron la placas y se añadió IgG (cadena pesada y ligera) anti inmunoglobulina (IgG) humana conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Aunque este conjugado mostró preferencia para unirse a anticuerpos IgG, también demostró capacidad para unirse a otras subclases de IgG (IgA, IgM, IgD e IgE) cuando los isotipos de Ig respectivos se inmovilizaron en la placa de microtitulación. Después del paso de lavado, se añadió la solución sustrato y se incubó. La reacción se paró con una solución ácida antes de medir los valores de DO a 450 nm en un lector de placas. Para comparar los resultados entre placas los datos se presentaron como DO normalizadas (DON), obtenidos dividiendo la media de DO de la muestra entre la media de DO de CP1. En el siguiente paso de confirmación de esta prueba (segunda ELISA), las muestras diluidas se preincubaron con o sin VLP de virus JC a una concentración final de 1 µg/ml y luego se analizaron siguiendo el procedimiento del paso anterior de *screening*. Los datos se presentaron como porcentaje de inhibición de la señal por muestra preincubada con VLP del virus JC comparado con la preincubada con el buffer del ensayo. Los resultados finales se presentaron siguiendo el esquema de la figura 19. Las muestras positivas se evaluaron seguidamente en un ensayo de titulación en el cual las

muestras se analizaron a distintas diluciones siguiendo el procedimiento del ensayo de *screening*¹⁸¹.

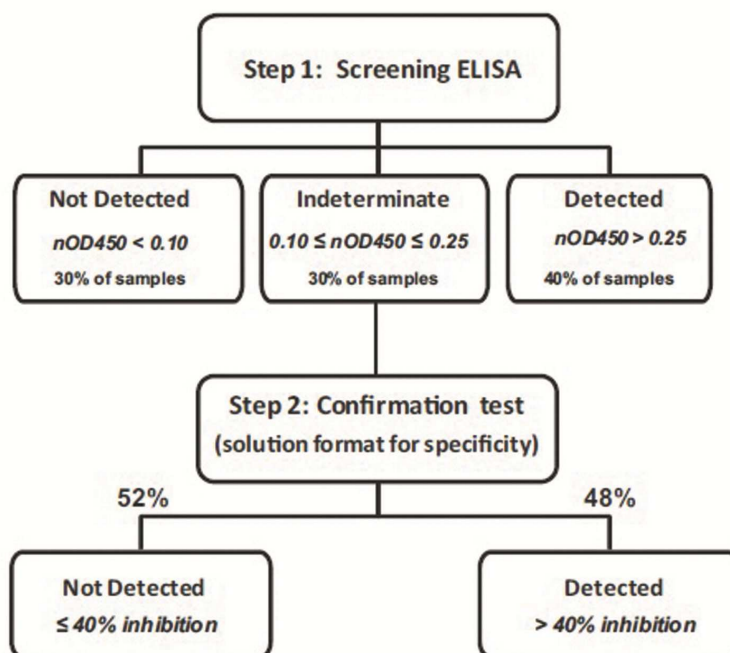


Figura 20. Esquema de la prueba para valorar anticuerpos anti-JC (figura extraída de Plavina y col.¹⁸¹).

3.5 Determinación de niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-HHV-6

Se llevó a cabo en muestras de suero recogidas en las visitas programadas. El ensayo se realizó mediante un método de ELISA (Panbio) con pocillos recubiertos con el antígeno del HHV-6. La detección y cuantificación de las inmunoglobulinas anti-HHV-6 que quedan unidas al antígeno en los pocillos, se llevó a cabo mediante una reacción colorimétrica utilizando un conjugado de peroxidasa y el cromógeno TMB (tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno) como sustrato de la enzima. Las medidas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 450 nm con un filtro de referencia de 600-650 nm (Tecan) tras detener el desarrollo de la reacción con una solución de parada (ácido fosfórico 1 M).

Para la calibración, se midieron los calibradores por triplicado, realizándose un control negativo y positivo por cada 40 muestras.

El resultado del título de anticuerpos se presentó en unidades Panbio. Para el cálculo de la prevalencia se consideró títulos de Ig mayores o iguales a 9 unidades Panbio como positivo.

3.6 Clonación y secuenciación

El ADN extraído de las muestras indicadas en la tabla 12 de los 3 pacientes que participaron en el estudio de la identificación de las variantes del virus JC (P56, P1004 y P89) fue clonado y secuenciado de la forma en la que se especifica en este apartado.

El proceso de clonación se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial del Kit TOPO TA Cloning (K4520-01, Invitrogen™) en distintos pasos que describiremos a continuación:

- 1) Amplificación de la RR del virus JC mediante *nested*-PCR a partir del ADN extraído de cada muestra de interés. La *nested*-PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de *primers* en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los *primers* externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los *primers* internos para amplificar la región específica. Las condiciones de la *nested*-PCR llevada a cabo en este estudio fueron descritas con anterioridad por Mónaco y col.¹³⁵. Para evitar contaminaciones cruzadas en cada reacción de *nested*-PCR sólo se analizó una muestra a distintas diluciones; además, se emplearon dos blancos (controles negativos compuestos de la mezcla de reacción y agua libre de nucleasas en vez de ADN) en cada reacción de *nested*, analizando en la segunda reacción los blancos de la primera. Además, con el fin de obtener la mayor cantidad de nuestro fragmento esperado se volvió a hacer una batería de diluciones de cada muestra amplificada en la primera reacción.
- 2) Selección del producto de la segunda reacción de la *nested* con un tamaño correspondiente a la RR del virus JC. Los productos de la segunda reacción de esta *nested*-PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, y se seleccionó la dilución con un tamaño de amplicón o amplicones adecuado, en torno a los 380 pb, dependiendo del número de duplicaciones y deleciones posibles, para iniciar el proceso de clonación.
- 3) Inserción del producto de la *nested*-PCR en un vector plasmídico (pCR®2.1TOPO®). La Taq polimerasa utilizada en la *nested*-PCR añade en el extremos 3' de los productos de reacción una cola de adeninas (A), que se unirán

a los residuos de timina (T) presentes en el vector mediante la acción de una topoisomerasa I unida a dicho vector.

- 4) Transformación de las bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α TM-T1[®] por choque térmico. Tras la incubación durante 30 minutos en hielo de las bacterias con el vector-producto de *nested*-PCR (figura 21) este último atravesará la pared celular mediante un choque de calor, 30 segundos a 42°C.

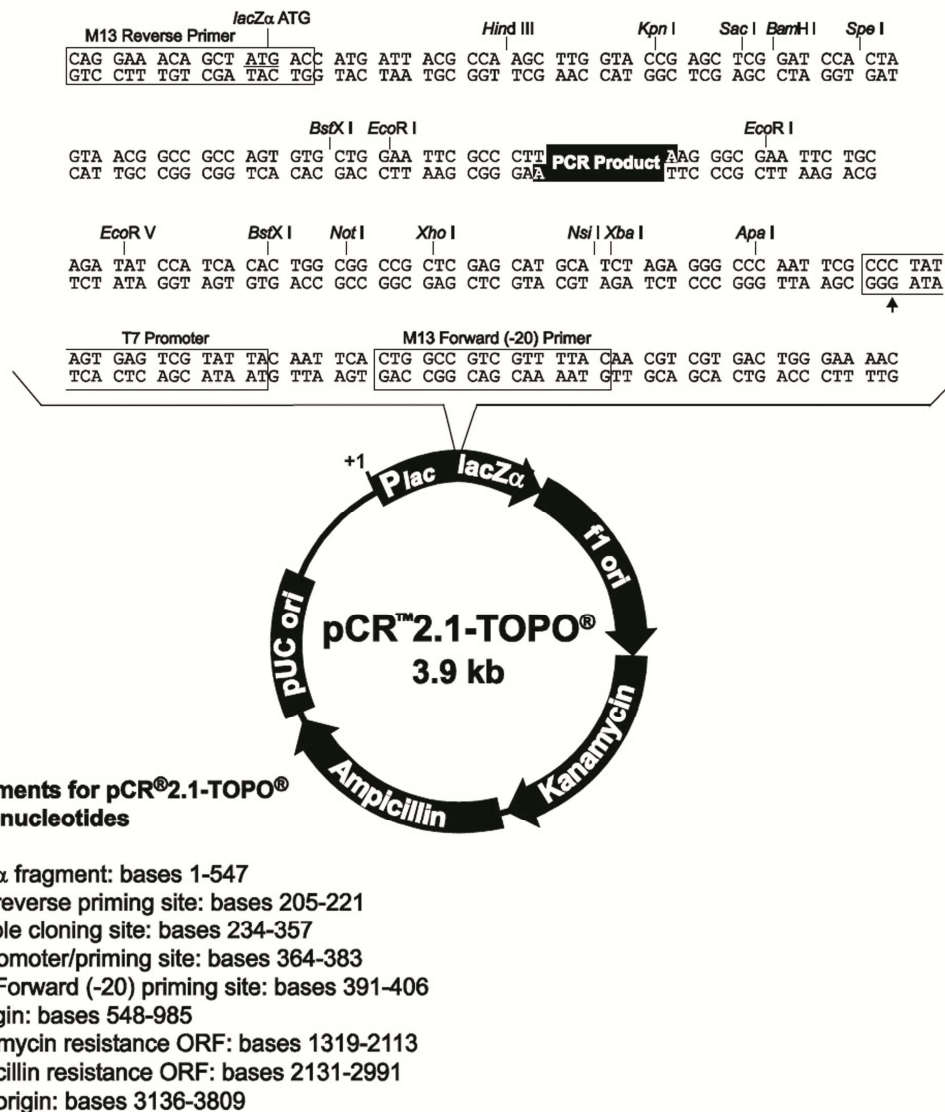


Figura 21. Mapa con las características del vector pCR[®]2.1-TOPO[®] y la secuencia rodeando al sitio de inserción del producto de *nested*-PCR. Se especifican los sitios donde actuarían las enzimas de restricción y las flechas indican el inicio de la transcripción por la polimerasa T7.

- 5) Selección de las colonias transformadas, aproximadamente 30-40 por muestra, de las placas de agar con kanamicina. Se seleccionarán sólo las blancas, ya que la inserción del vector con el producto de la *nested*-PCR se produce en la mitad

del gen que codifica para una enzima cuyo sustrato añadimos a la placa de agar y cuyo producto es azul. Es decir, si el vector no se ha insertado correctamente la enzima se sintetiza consumiendo el sustrato presente en la placa de agar y adquiriendo un color azul.

- 6) Incubación de cada colonia transformada en LB agar líquido con kanamicina y posterior extracción del material genético de cada clon siguiendo las instrucciones del fabricante del kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep (K2100-10, Invitrogen™).
- 7) Aislamiento del fragmento insertado, la RR del virus JC, del resto del vector mediante una amplificación por PCR utilizando los *primers* M13 del kit TOPO TA Cloning en cada clon.
- 8) Marcaje de cada nucleótido [A, T, guanina (G) y citosina (C)] del amplicón que queremos secuenciar con un fluorocromo distinto, mediante la utilización del kit BigDye Cycle sequencing (Applied Biosystems. Carlsbad, California, USA) y un primer, forward o reverse, empleado en la segunda reacción de la *nested*-PCR.
- 9) Purificación de estos ADNs con el kit BigDye®XTerminator™ Purification (Applied Biosystems. Carlsbad, California, USA) y posterior secuenciación mediante electroforesis capilar en el equipo ABI PRISM ®3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para llevar a cabo el análisis de la RR, las secuencias se alinearon y mapearon con la secuencia de la RR de la variante arquetípica ¹⁰⁵ con la ayuda del programa Mutation Surveyor® V4.0.6. La región reguladora de la variante arquetípica fue dividida en fragmentos para describir los distintos patrones recurrentes de delección y duplicación ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Las 7 regiones son: ORI, A, B, C, D, E y F (divida a su vez en F1 y F2) secuencialmente y siguiendo la dirección 5'-3'. Usaremos las distintas combinaciones de letras para describir los diferentes patrones de RR. Siguiendo la notación de Reid y col. ¹¹⁰ las letras mayúsculas en el patrón de RR representan que coincide perfectamente con la correspondiente región de la secuencia arquetípica, mientras que una letra minúscula indica que es una región con delección y un asterisco denota una mutación puntual.

4. ESTADÍSTICA

A lo largo de los distintos estudios las variables continuas (ej.: edad, tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad, carga viral,...) en el caso de distribución normal y homocedasticidad fueron expresadas como media y desviación estándar (mínimo, máximo); y en el caso que no cumplieran las ya citadas condiciones, como mediana (percentil 25, percentil 75); mientras que las variables categóricas (sexo, prevalencia viral,...) fueron expresadas como porcentajes.

Los valores de las variables categóricas fueron comparadas usando el test de Chi cuadrado (χ^2), el test exacto de Fisher (cuando los valores esperados son menores de 5) o el de asociación de lineal por lineal (en el caso de variables ordinales de más de dos categorías y cuando los valores esperados son menores de 5). Los valores en distintos grupos de una misma variable continua se contrastaron usando el test de la U de Mann-Whitney.

Por otro lado, el grado de concordancia entre dos instrumentos de medida cuyo resultado es categórico (qPCR y doble ELISA) fue estimado mediante el índice Kappa; de tal forma que, valores menores de 0 indican que no hay concordancia, ente 0-0,2 acuerdo insignificante, 0,21-0,4 mediano, 0,41-0,6 moderado, 0,61-0,8 sustancial y entre 0,81 y 1 acuerdo casi perfecto.

El test de McNemar fue empleado para estudiar la relación existente entre dos valores de una variable categórica (prevalencia viral) en dos puntos distintos del tratamiento (siempre la VB comparada con el resto de visitas). Tras comprobar que los valores de la carga viral no se ajustaban a una distribución normal, procedimos a transformarlos en logaritmos decimales de base 10, pero al seguir sin cumplir esta condición fueron evaluados mediante test no paramétricos, como todas aquellas variables no normales ni homocedásticas. Teniendo en cuenta que el log de 0 no existe se sumó una unidad a todos los valores de carga viral para llevar a cabo la transformación logarítmica. Así pues, utilizamos el test de Friedman para verificar una posible diferencia entre los valores de una misma variable continua tomados en distintos puntos del tratamiento (carga viral, títulos de anticuerpos,...) y el test de Wilcoxon para comparar los valores de una misma variable continua entre dos puntos en el tiempo (siempre la VB comparada con el resto de visitas). La posible correlación entre dos variables continuas fue establecida con el coeficiente no-paramétrico de Spearman.

En el caso de que algún sujeto tuviera algún valor perdido para alguna de las variables estos se omitieron del análisis correspondiente. P valores menores de 0,05 fueron considerados como estadísticamente significativos en este texto. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando el software SPSS para Windows (Ver. 15.0).

Por último, la comparación de las frecuencias alélicas entre los distintos subgrupos de pacientes se realizó mediante el test χ^2 o test exacto de Fisher (cuando los valores esperados fueron menores de 5) pero utilizando el programa Statcalc (EpiInfo v6, CDC, Estados Unidos/WHO, Suiza). En el caso de utilizar el test exacto de Fisher, se escogió el valor de p de dos colas, puesto que *a priori* se desconoce en qué sentido va el efecto deseado. También se empleó este programa para calcular la intensidad de la asociación o el efecto en las comparaciones 2x2 mediante las odds ratio (OR) y su intervalo de confianza. La estimación de los intervalos de confianza al 95% de las ORs se llevó a cabo mediante el método de Cornfield, siempre y cuando los valores esperados fueran mayores de 5, en caso contrario se calcularon los límites exactos. Además, se determinó la potencia estadística, es decir, la capacidad de detectar de forma significativa una asociación real entre un alelo y su fenotipo. Esta potencia depende de 3 factores: el tamaño de la muestra, el efecto que el alelo asociado a la enfermedad tiene sobre la población (OR) y la frecuencia del alelo minoritario; de tal forma que la potencia estadística de un estudio es mayor, cuanto mayor sea el tamaño muestral, la OR o cuando la frecuencia alélica se acerque a valores intermedios. Según la literatura, una potencia estadística igual o superior al 80% se considera aceptable. En todas las estimaciones llevadas a cabo con el paquete estadístico EpiInfo v6 se consideró estadísticamente significativo valores de p menores de 0,05.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LA REACTIVACIÓN DEL VIRUS JC A LO LARGO DEL TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB (qPCR)

REACTIVACIÓN DEL VIRUS JC	
Diseño	Cohortes abierto: VB, V3, V6, V9...V39
Participantes	100 EM NTZ
Variables	Niveles de ADN virus JC (qPCR) PBMCs, suero y orina
Ampliación	Caso control transversal: comparación de niveles de ADN viral en PBMCs, suero y orina en VB de los 100 NTZ con los de 263 controles

Estudios previos apuntan que el riesgo de padecer LMP en los pacientes de EM tratados con natalizumab aumenta con el tiempo de tratamiento ⁵⁹. Por ello, nos planteamos estudiar los cambios de la presencia del virus JC en los posibles sitios de latencia virales: sangre y orina, a lo largo del tratamiento, comprobando previamente los niveles basales de nuestra cohorte de EM sin tratamiento con respecto a los de una cohorte de individuos sanos.

1.1 Comparación de los niveles de ADN del virus JC en PBMCs, suero y orina entre la cohorte de controles sanos y la VB (sin tratamiento) de los pacientes de EM

En este apartado también valoramos la relación existente entre la edad y la prevalencia/carga viral del virus JC en orina en la población total: nuestros pacientes de EM junto con una cohorte de controles sanos. Como vemos en la gráfica (figura 22) existe correlación entre ambos parámetros $r^2=0,217$ $p=0,001$ (test de Spearman). Este coeficiente no sufrió grandes modificaciones cuando dividimos nuestra población total en pacientes ($r^2=0,223$ $p=0,03$, test de Spearman) y controles sanos ($r^2=0,22$ $p=0,013$, test de Spearman).

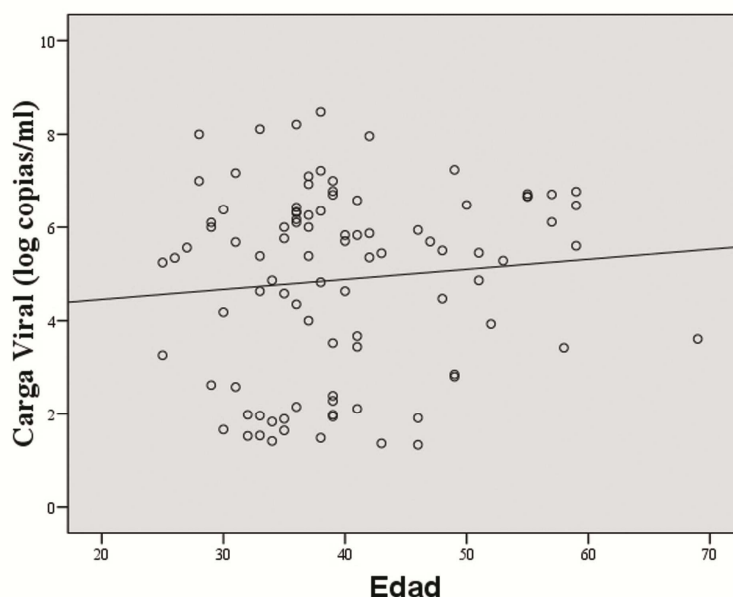


Figura 22. Variación de la carga viral del virus JC en orina (log copias/ml) en función de la edad (años) en toda la población de estudio, tanto controles sanos como pacientes de esclerosis múltiple antes de comenzar el tratamiento con natalizumab (test de Spearman, $r^2=0,217$ $p=0,001$).

Sin embargo, no encontramos diferencias significativas al comparar la prevalencia viral en las distintas franjas de edades, ni en controles sanos ni en pacientes de EM (tabla 13).

Tabla 13. Prevalencia del virus JC en orina en función de la edad (años). No existe diferencias significativas ni en pacientes de esclerosis múltiple (EM) sin tratar (visita basal de tratamiento con natalizumab) ni en controles sanos (test de χ^2 , $p>0,05$).

	EM	Controles
≤ 30 años	5/15 (33,3)	7/26 (26,9)
30-40 años	29/52 (55,8)	16/57 (28,1)
> 40 años	17/32 (53,1)	20/43 (46,6)

Datos expresados en número positivos/pacientes totales (porcentaje de positivos).

Con respecto a la prevalencia del ADN del virus JC en orina de sanos (34,4%) fue significativamente menor que la encontrada en la VB de nuestra cohorte de enfermos (52%) (tabla 14). Sin embargo, la carga viral en sanos (5,7 (4,4, 6,7) log copias/ml) fue significativamente mayor que en pacientes de EM (4,8 (2, 6,3) log copias/ml), $p=0,028$ (test de Mann Whitney). En lo que se refiere a la prevalencia del virus JC en PBMCs o en suero, no encontramos diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 14. Prevalencia del virus JC en orina, PBMCs y suero de 100 pacientes de esclerosis múltiple (EM) sin tratar y 128 controles sanos (test de χ^2 , $p>0,05$).

	EM n=100	Controles n=128	P
PV orina	52 (52)	44 (34,4)	0,007
PV PBMCs	1 (1)	3 (2,7)	>0,05
PV suero	0 (0)	0 (0)	>0,05

Datos expresados en número positivos (porcentaje de positivos). PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; PV: prevalencia.

Un factor a tener en cuenta cuando se realizan estudios longitudinales del virus JC en orina es la tendencia al aumento de la prevalencia de este virus con la edad, como ha sido descrito previamente en la bibliografía en controles sanos ^{132,182,183}. Si bien encontramos una correlación, aunque pequeña, entre la carga viral en orina y la edad, tanto en la población total como en los grupos que la componen: controles sanos y pacientes, no encontramos diferencias significativas al comparar la prevalencia viral en las distintas franjas de edades en dichos grupos de estudio (tabla 13). Es decir, si bien parece existir una tendencia al aumento de la presencia viral en orina con la edad, este factor no modificaría nuestros resultados durante el tiempo de duración del estudio, aproximadamente 4 años. Hemos de tener en cuenta, además, que el número de pacientes con más de 60 años incluidos en el estudio, edad a partir de la cual sí que parece existir un claro incremento de la prevalencia en orina, fue muy reducido ¹³².

En lo que se refiere a la prevalencia del virus JC, la mayoría de estudios llevados a cabo en población sana describen prevalencias en orina superiores a las nuestras: 40,2% ¹⁸⁴, 46,7% ¹⁸³, 40,9% ¹⁸², a excepción del realizado por Egli y col. ¹⁸⁵, con un valor del 19%; en lo que se refiere a enfermos de EM sin tratar, los porcentajes descritos en otros estudios son menores que en nuestra cohorte: 26% ¹⁸⁶, 24,5% ⁵⁸, 19% ⁸². Estas diferencias es probable que se deban a los distintos métodos de extracción de ADN utilizados, al igual que al uso de *primers* y condiciones de qPCR diferentes, que implicarían la existencias de distintos límites de detección de la técnica. La sensibilidad de la qPCR de este estudio es mayor que en la mayoría de estos estudios previos, con lo que esperaríamos obtener frecuencias algo más elevadas, tanto en controles sanos como en EM; y así fue, pero sólo en el caso de los pacientes con EM.

Los pacientes de EM en la VB del estudio longitudinal no estaban siendo tratados, con lo que cabría pensar que la prevalencia de virus JC en los distintos compartimentos fuera parecida a la de la población sana. Sin embargo, este porcentaje en orina de sanos fue significativamente menor que el encontrado en EM; probablemente debido a las diferencias de protocolo existentes para la recolección de las muestras entre ambos grupos. Mientras los pacientes facilitaron la primera orina del día y se mantuvo en condiciones de refrigeración hasta que se procedió a la inmediata extracción de su ADN, no sucedió lo mismo con las muestras de orina de los controles sanos (las de PBMCs y suero siguieron el mismo protocolo que en pacientes). Puede ser que el virus posea distinto ritmo de excreción en orina según el momento del día, al igual que parece haber ligeras diferencias en la excreción según la estación ¹⁸³ o que al no haber una refrigeración y extracción del ADN inmediata no pudiéramos detectar las concentraciones más bajas, de ahí también, la diferencia de cargas virales encontradas, significativamente mayor en los controles sanos. En cualquier caso, al no existir estudios previos en población española, ni en población sana ni en EM, resulta difícil de contrastar los resultados obtenidos.

En PBMCs detectamos el virus JC en un paciente y en 3 sanos, mientras que en suero no lo detectamos en ninguno de los dos grupos. Es decir, no detectamos el virus reactivado en suero en controles sanos y pacientes de EM no tratados con natalizumab, mientras que lo detectamos en PBMCs, uno de los sitios de latencia del virus JC ^{141,148}.

1.2 Efecto del natalizumab en la reactivación del virus JC en orina a lo largo del tratamiento

En nuestra cohorte de enfermos de EM tratados con natalizumab al menos durante 6 meses apreciamos un aumento significativo de la prevalencia del virus JC en orina entre la VB y el resto de visitas comenzando por el mes 9, pasando de un 52% de pacientes positivos en VB a un 72,7% al cabo de 9 meses (tabla 15).

Tabla 15. Prevalencia del virus JC en orina a lo largo del tratamiento con natalizumab en todos los pacientes de esclerosis múltiple, y sólo en aquellos que excretaron el virus JC de forma intermitente en orina (JCV interm en orina). Test McNemar entre la VB y el resto, *:p <0,05, **:p<0,01.

	VB	V3	V6	V9	V12	V15	V18	V21	V24	V27	V30	V33	V36	V39
Todos los pacientes	52/100 (52)	62/98 (63,3)	59/95 (62,1)	64/88 (72,7)**	54/78 (69,2)**	50/70 (71,4)**	44/64 (68,8)*	44/64 (68,8)*	41/63 (65,1)*	37/51 (72,5)**	35/45 (77,8)**	29/39 (74,4)**	23/32 (71,9)*	19/24 (79,2)*
JCV interm en orina	18/52 (34,6)	29/51 (56,9)	28/50 (56)	34/47 (72,3)**	33/45 (73,3)**	29/39 (74,4)**	26/28 (68,4)**	27/37 (73)**	24/37 (64,9)*	21/28 (75)**	22/25 (88)**	18/21 (85,7)**	14/19 (73,37)*	12/13 (92,3)*

Datos expresados en número positivos/pacientes totales (porcentaje de positivos). VB: visita basal sin tratamiento, V3: visita tras 3 meses con natalizumab.

Con respecto a la carga viral en orina, existe una diferencia significativa entre todas las visitas (test de Friedman, $p=0,00018$), más precisamente un aumento de la misma a partir de la visita a los 9 meses cuando comparamos cada una de las visitas con la basal (test de Wilcoxon, $p<0,05$) (tabla 16).

Tabla 16. Cargas virales (log copias/ml) del virus JC (JCV) en orina durante el tratamiento con natalizumab en pacientes que excretan el virus de forma permanente o intermitente en orina. Test Wilcoxon entre la VB y el resto, *: $p<0,05$, **: $p<0,001$.

	En toda la población (log copias/ml)	JCV permanente en orina (log copias/ml)	JCV intermitente en orina (log copias/ml)
VB	0 (0, 4,9)	5,9 (4,6, 6,6)	0,9 (0, 1,8)
V3	2,2 (0, 5,2)*	6,2 (4,9, 6,9)	1,4 (0, 2,4)*
V6	2,1 (0, 5,4)	6,2 (5,1, 6,9)	1,6 (0, 2,6)
V9	2,4 (0, 4,9)*	5,6 (4, 6,6)	1,8 (0, 2,7)*
V12	2,3 (0, 5,6)**	6,8 (5,5, 7,3)	2,1 (0, 2,8)*
V15	2,4 (0, 6)**	6,5 (6, 7,6)	2,1 (0, 3)*
V18	2,5 (0, 5,2)**	6,5 (5,4, 7,6)	1,9 (0, 2,8)**
V21	2,7 (0, 4,7)**	6,8 (5,5, 7,2)	2,3 (0, 3,2)*
V24	2,2 (0, 5,8)*	7 (6,2, 7,2)	1,9 (0, 2,9)*
V27	2,8 (0,6,3)**	6,5 (6,3, 7,4)	2,2 (0,4, 3,2)**
V30	2,5 (1,4, 6,6)**	7,7 (6,6, 7,8)*	2,6 (1,7, 3,3)**
V33	2,8 (0, 6,3)**	7 (6,5, 7,5)	2,5 (1,6, 3,5)**
V36	2,4 (0, 5,7)*	7,1 (5,7, 7,7)	1,9 (0, 2,6)*
V39	3,1 (1,6, 3,5)*	7,2 (5,3, 7,7)	2,6 (1,8, 3,5)*

VB: visita basal sin tratamiento, V3: visita tras 3 meses con natalizumab.

Además, en función del tipo de excreción del virus JC en orina, dividimos a nuestra población en 3 grupos: individuos con excreción permanente (34% de los pacientes), intermitente (52%) o ausente (14%). Es de destacar que, la mediana de la carga viral media de cada paciente a lo largo de todas las visitas durante el tratamiento en el primer grupo (6,2 (5,2, 6,9), fue significativamente mayor que la del grupo con excreción intermitente del virus en orina (2,6 (2,2, 3,1) (test de U de Mann-Whitney, $p=8,7 \cdot 10^{-12}$) (figura 23). Además, la carga viral en aquellos pacientes que excretaron el virus de forma permanente no varió a lo largo del tratamiento cuando comparamos la VB con el resto, excepto entre la VB y la V30 (test de Wilcoxon, $p=0,003$); ni tampoco, según el test de Friedman ($p=0,4$), se detectó diferencia alguna entre las distintas cargas virales de cada visita durante el tratamiento. Mientras que en aquellos pacientes en los que

detectamos al virus de forma intermitente, tanto la prevalencia como la carga aumentaron de forma significativa a lo largo del tratamiento (tabla 15 y 16).

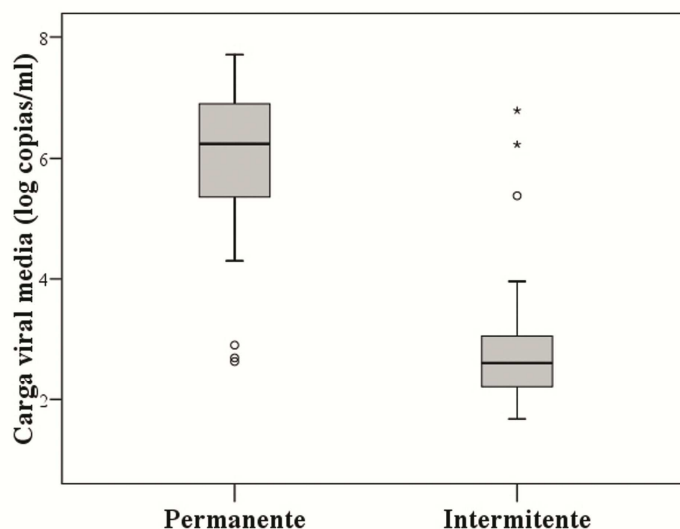


Figura 23. Carga viral media del virus JC en la orina de cada paciente durante las distintas visitas del tratamiento con natalizumab. En los pacientes que tienen una excreción del virus JC permanente [(6,2 (5,2, 6,9)] fue significativamente mayor que en aquellos que tienen una excreción intermitente [2,6 (2,2, 3,1)] (test de U de Mann-Whitne, $p=8,7 \cdot 10^{-12}$).

El incremento de la prevalencia en orina del virus JC con el tiempo del tratamiento detectado en este estudio, no ha sido descrito en la mayor parte de trabajos previos de características similares¹⁸⁶⁻¹⁸⁹, a excepción de en el de Chen y col.⁸².

Como hemos apuntado con anterioridad, estas diferencias se deban probablemente a los distintos límites de detección de las técnicas empleadas. Así pues, nuestro porcentaje de individuos con excreción constante del virus en orina y con mayor carga viral, que podría ser detectada mediante qPCR con límites de detección mayores, se aproxima más a los publicados previamente, 26%^{186,190} y 24,5⁵⁸.

Sin embargo, sí hemos logrado la clasificación de nuestros pacientes en tres grupos en los que el virus JC parece comportarse de forma distinta a lo largo del tratamiento:

1. individuos con excreción permanente del virus JC, a los que el tratamiento con natalizumab no parece afectarles, pues los niveles de carga viral se mantienen similares a lo largo de todo el tratamiento.
2. pacientes con excreción intermitente del virus JC, cuya prevalencia y carga viral va aumentando a lo largo del tiempo como consecuencia del tratamiento con el anticuerpo monoclonal.

3. enfermos que no excretan el virus JC por la orina, bien porque nunca han sido infectados por el virus, bien porque el virus JC establece latencia en otros sitios diferente de los riñones.

1.3 Efecto del tratamiento con natalizumab en la reactivación del virus JC en PBMCs/suero a lo largo del tratamiento

Entre nuestra cohorte de pacientes de EM (n=100), un 23% fueron positivos alguna vez a virus JC en PBMCs y/o suero a lo largo del tratamiento con natalizumab sin tener en cuenta la visita basal (sin tratamiento); más concretamente, un 13% en suero y un 14% en PBMCs (tabla 17).

Tabla 17. Pacientes de esclerosis múltiple (EM) en los que se ha detectado ADN del virus JC (positivo) en PBMCs y/o suero durante el tratamiento con natalizumab, mes en el que se produce dicha detección, última visita del estudio longitudinal en la que el paciente recibe natalizumab (meses) y tipo de excreción del virus JC en orina.

Paciente EM	Positivo en PBMCs (mes)	Positivo en suero (mes)	Duración de tratamiento (meses)	Tipo de excreción orina
P12	36	-	39	Intermitente
P16	36	-	51	Permanente
P18	9	-	27	Intermitente
P25	-	27	51	Intermitente
P27	12	12	36	Intermitente
P28	42	33	42	Intermitente
P32	-	42	42	Intermitente
P37	27	-	27	Intermitente
P43	-	33	36	Intermitente
P50	27	-	27	Intermitente
P52	-	39	36	Intermitente
P56	15, 18, 21, 24	18	24	Intermitente
P61	36	-	48	Intermitente
P66	21	-	30	Permanente
P74	15	-	33	Permanente
P77	15	-	15	Permanente
P89	45	45	47	Permanente
P91	6	-	9	Permanente
P116	-	9	9	Intermitente
P1004	24	24	24	Intermitente
P1006	-	6	12	Permanente
P1007	-	9	18	Intermitente
P1009	-	27	30	Intermitente

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; VB: visita basal sin tratamiento.

De tal forma que, sólo 4 pacientes fueron positivos simultáneamente en PBMCs y suero a lo largo del tratamiento. En dos de estos pacientes, P89 y P1004, detectamos el virus JC casi simultáneamente al desarrollo de la LMP, momento en el cual se interrumpió el tratamiento, en el mes 47 y 24 respectivamente. Mientras que en los otros dos, P27 y P56, la detección no se relacionó con el desarrollo de la patología. Es más, en P56, se detectó el virus JC de forma mantenida en el tiempo (durante 4 visitas consecutivas), al igual que en P28 (donde se identificó el virus en V33 y V42), pero ninguno de los dos presentaron síntomas clínicos compatibles con la sospecha de LMP.

Así mismo, las prevalencias del virus JC tanto en PBMCs como en suero en función del tipo de excreción viral en orina se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentaje de pacientes en los que se ha detectado el ADN del virus JC (positivos) en PBMCs o suero alguna vez durante el tratamiento con natalizumab con excreción del virus JC en orina permanente o intermitente (test de χ^2).

	JCV permanente en orina	JCV intermitente en orina	p
Alguna vez + PBMCs	6/33 (18,2)	9/52 (17,3)	0,918
Alguna vez + suero	2/33 (6,1)	11/52 (21,2)	0,06

Datos expresados en número de pacientes positivos/pacientes totales (porcentaje de positivos). PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

La primera detección del virus JC a lo largo del tratamiento, tanto en PBMCs como en suero, se produjo después de al menos 6 meses de tratamiento con el anticuerpo monoclonal, más precisamente habiendo transcurrido una media de 22,5 (15, 36) y 24,9 (10,5, 36) meses respectivamente, cuando según estudios previos parece aumentar el riesgo a padecer LMP⁵⁹.

En la mayor parte de los trabajos publicados no se ha detectado el virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab en PBMCs, es decir en estado latente, ni tampoco en suero, lo que implicaría una reactivación del mismo^{186,187}; únicamente Chen y col.⁸² junto con Sadiq y col.¹⁹¹ encontraron resultados similares. Tal vez esto se deba, una vez más, a los distintos protocolos llevados a cabo en cada laboratorio.

No parece que la reactivación del virus en sangre esté relacionada con el tipo de excreción del virus JC en orina, aunque sí parece que haya una cierta tendencia a la reactivación viral en suero en aquellos paciente con presencia intermitente del virus en orina (21,2%) frente a los que tienen una excreción del virus permanente (6,1%).

La presencia del virus JC en PBMCs no parece ser un factor de riesgo de LMP, pues el virus probablemente estaría en estado de latencia, si bien también podría estar replicándose sin llegar a una lisis de las células; en cualquier caso, también lo detectamos en pacientes sanos sin consecuencia clínica alguna. Sin embargo, el virus JC en suero, claro indicador de la reactivación viral, no fue detectado en individuos sanos ni en los pacientes de EM en la VB. Tal vez, habría que prestar mayor atención a estos individuos en los que detectamos el virus JC en suero a partir de los dos años de tratamiento con natalizumab, siendo dicha reactivación más frecuente en los individuos que excretan el virus de forma intermitente en orina.

Como hemos indicado anteriormente, los resultados analizados nos han permitido señalar la existencia de 3 perfiles de excreción del virus en orina: permanente (sin aumento de la carga viral en orina durante el tratamiento), intermitente (con un aumento de la prevalencia y de la carga viral con natalizumab) y ausente. Siendo el segundo grupo en el que se aprecia una mayor tendencia a detectar el virus JC en suero, es decir reactivado, y con, tal vez, una mayor probabilidad de dirigirse al SNC. La existencia de distintos perfiles de excreción del virus en orina podría apuntar a la existencia de diferencias a nivel inmunológico o incluso virológico entre los tres grupos descritos, que podrían influir posteriormente en un mayor o menor riesgo de padecer LMP. Si bien, se deberían realizar más estudios para determinar las consecuencias patológicas de este aumento de la prevalencia y de la carga viral como consecuencia del tratamiento con este inmunosupresor.

2. ESTUDIO COMPARATIVO DE TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VIRUS JC (DOBLE ELISA VS qPCR)

qPCR VS ELISA	
Diseño	Transversal
Participantes	82 EM NTZ y 55 EM no NTZ
Variables	Presencia de anticuerpos anti-JC (doble ELISA) y niveles de ADN viral (qPCR) PBMCs, suero y orina
Ampliación	Cohortes: 23 NTZ y 10 no NTZ con una segunda medición de anticuerpos anti-JC y ADN viral

Un requisito indispensable para el desarrollo de la LMP es que el individuo haya estado en contacto previo con el virus JC; con lo cual, la detección del mismo en los pacientes de EM tratados con natalizumab es un punto clave a tener en cuenta. En este apartado, estudiaremos la utilidad de la detección del ADN del virus JC por qPCR además de la determinación de la presencia de anticuerpos anti-JC mediante doble-ELISA (técnica utilizada por consenso científico para la estratificación del riesgo de padecer LMP en pacientes de EM tratados con natalizumab), para identificar a aquellos pacientes que están o han estado en contacto con el virus JC. Además, describiremos la influencia de distintos factores epidemiológicos sobre esos dos parámetros: la seroprevalencia de anticuerpos anti-JC y los niveles de ADN viral en nuestra cohorte de población española, no descrita con anterioridad.

2.1 Estudio de los niveles de ADN viral y anticuerpos anti-JC en función de distintas variables clínicas

La tasa de seropositividad de los anticuerpos anti-JC fue de un 62,3% (86/138) en el conjunto de la población, pacientes de EM tratados y no tratados con natalizumab. La seroprevalencia en hombres y mujeres fue similar, y la frecuencia de anticuerpos anti-JC no varió en función de la edad de los pacientes, ni del periodo de tiempo desde el diagnóstico de la EM; si bien, se detectó una cierta tendencia al aumento de dicha frecuencia a edades más avanzadas (tabla 19).

Tabla 19. Seroprevalencia de anticuerpos anti-JC y prevalencia del ADN del virus JC en orina en los pacientes de esclerosis múltiple, tanto tratados como no tratados con natalizumab.

	Ab JCV +		Ab JCV -		^a p	ADN JCV orina +		ADN JCV orina -		^a p
	n	%	n	%		n	%	n	%	
Sexo										
Mujer	60	63,2	35	36,8	0,76	50	56,8	38	43,2	0,384
Hombre	26	60,5	17	39,5		26	65	14	35	
Edad, a										
20-31	9	42,9	12	57,1	0,14	8	40	12	60	0,067
32-39	32	59,3	22	40,7		28	53,8	24	46,2	
40-49	34	69,4	15	30,6		29	67,4	14	32,6	
50-64	9	75	3	25		9	81,8	2	18,2	
Tiempo DIG, a										
1 a 5	15	53,6	13	46,4	0,59	16	59,3	11	23,9	0,868
6 a 9	22	62,9	13	37,1		21	60	14	30,4	
10 a 13	18	64,3	10	35,7		14	53,8	12	26,1	
≥ 13	20	71,4	8	28,6		17	65,4	9	19,6	
*TT previo										
INF	33	70,2	14	29,8	0,39	29	61,7	18	38,3	0,207
AG	5	50	5	50		4	40	6	60	
Ambos	14	73,7	5	26,3		14	73,7	5	26,3	
	n	Mediana (P25, P75)	n	Mediana (P25, P75)	^b p	n	Mediana (P25, P75)	n	Mediana (P25, P75)	^b p
*Duración NTZ, m	55	20 (10, 29)	27	22 (13, 27)	0,95	49	20 (12, 29)	33	22 (10,5, 25)	0,593
*Tiempo de TT previo, m	52	30,5 (15,3, 48,3)	25	18 (8,5, 55,5)	0,08	47	31 (15, 50)	30	18 (10,5, 39)	0,093

A: años; ADN JCV orina +/-: detección del ADN del virus JC en orina/no detección; Ab JCV: anticuerpos anti-JC; AG: acetato de glatiramer; DIG: diagnóstico; INF, interferón; M: meses; NTZ: natalizumab; TT: tratamiento. ^ap valor de test χ^2 , ^bp valor del test U de Mann-Whitney. *Solamente tratados con natalizumab.

El ADN de virus JC en orina lo detectamos en un 59,4% (76/128) del conjunto de la población, enfermos de EM tratados como no tratados con natalizumab. La frecuencia de detección del mismo fue similar para ambos sexos y no varió de forma significativa dependiendo del rango de edad estudiado (tabla 18). Detectamos una ligera tendencia al aumento de la carga del virus JC con la edad, si bien no llegó a ser significativa (test de correlación de Spearman, $r=0.206$, $p=0.076$) (figura 24 A). La prevalencia viral fue similar en los distintos grupos en función de la duración de la EM; de tal forma que tampoco se encontró correlación entre la carga viral y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad (test de correlación de Spearman, $r=0.052$, $p=0.674$) (figura 24 B). Se detectaron anticuerpos anti-JC en 4 de los 6 pacientes de EM previamente tratados con inmunosupresores (mitoxantrona o azatioprina), sin embargo el ADN del virus JC fue detectado solo en uno de estos 4 pacientes.

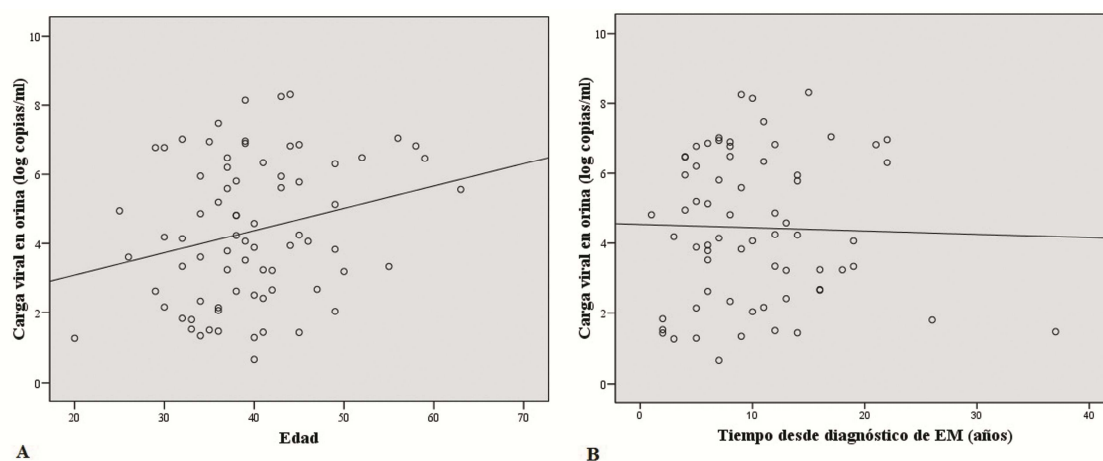


Figura 24. Correlación entre la carga viral en orina de los pacientes positivos y la edad en el momento de extracción de la muestra para el análisis de ADN en orina (test de correlación de Spearman, $r=0.206$, $p=0.076$) (A) y entre la carga viral en orina y el número de años transcurrido desde el diagnóstico de la esclerosis múltiple hasta la extracción de la muestra (test de correlación de Spearman, $r=0.052$, $p=0.674$) (B).

Nuestros resultados, en lo que a la tasa de seropositividad se refieren, fueron comparables con otros publicados previamente en pacientes tratados con natalizumab en Italia (52%)¹⁹², en Alemania (58.8%)¹⁹³, y en otra publicación muy reciente (59,7%)¹⁹⁴, aunque más elevados que en otros continentes⁵⁸. Sin embargo, la prevalencia viral en orina fue superior a la descrita anteriormente en pacientes tratados con natalizumab^{186,190}. En el caso de los anticuerpos las diferencias encontradas seguramente se deban a las distintas características epidemiológicas de la infección por virus JC en las diferentes poblaciones, mientras que en el caso de la prevalencia en orina nuestros resultados son más elevados porque nuestra qPCR tenía un límite de detección menor a los descritos en otros trabajos¹⁹⁰.

En el conjunto de nuestra población, tanto tratados como no tratados con el anticuerpo monoclonal, los niveles de ADN del virus JC y la presencia de anticuerpos anti-JC fueron similares en hombres y mujeres, en contraste con otros estudios de anticuerpos¹⁹³ y de prevalencia viral en orina en población sana¹⁸⁴ descritos previamente, donde estos porcentajes fueron mayores en hombres. Sin embargo, aunque sin alcanzar la significación, se puede apreciar un aumento de la frecuencia de anticuerpos anti-JC con la edad, además de una correlación positiva débil no significativa entre edad y carga viral. Todas estas tendencias han sido descritas con anterioridad, incluso en población sana, y justifican el seguimiento de estos parámetros durante la administración del

tratamiento con natalizumab ^{58,132,182-184,193}. El tratamiento previo con inmunosupresores y largos periodos de tratamiento no parecieron guardar relación con tasas elevadas de seroprevalencia de anticuerpos anti-JC, probablemente porque el aumento del riesgo de LMP con estos parámetros no está directamente relacionado con una infección por JC de *novo* como ya ha sido sugerido en otro trabajo ¹⁹³.

2.2 Comparación de los resultados de cuantificación del ADN en orina/PBMCs/suero con la detección de anticuerpos anti-JC mediante doble ELISA en el mismo punto del tratamiento en pacientes de EM tratados y no tratados con natalizumab

La concordancia entre los resultados obtenidos mediante doble ELISA y qPCR se estimó mediante el índice kappa, y resultó ser ($p=4,1E*10^{-6}$) (entre 0 a 1, desde ninguna a una perfecta concordancia). De esta forma, en función de los resultados obtenidos con las dos técnicas, dividimos a nuestra población en 4 grupos (figura 25), donde un 26% de los pacientes tuvieron un resultado distinto en función de la técnica empleada (12% de pacientes positivos solamente con qPCR más 14% de positivos solamente con doble ELISA).

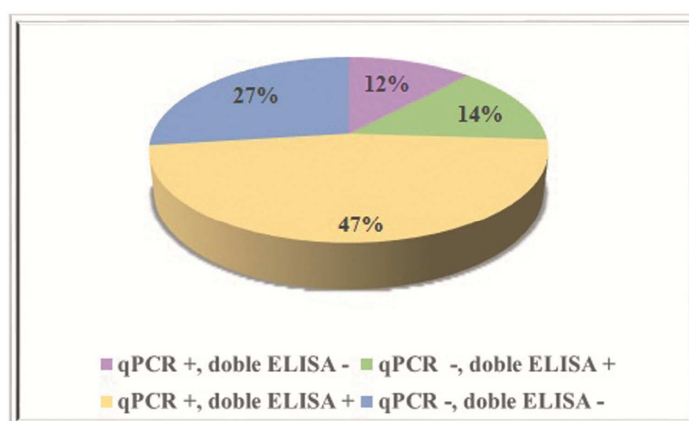


Figura 25. Porcentaje de pacientes con niveles detectables de JC usando solamente qPCR en orina (15/128), solamente con doble ELISA (18/128), cualquiera de las dos técnicas (61/128) o ninguna de las dos (34/128).

Además, los resultados fueron agrupados según el test de ELISA empleado en el análisis: doble ELISA (STRATIFY JCVtm Test), o doble ELISA de 2^a generación (STRATIFY JCVTM DxSelectTM) (tabla 20). Dada la diferencia entre el número de pacientes entre ambos grupos, se decidió no llevar a cabo ningún tipo de análisis estadístico, si bien en la tabla 20 se puede apreciar mayor porcentaje de positivos con el doble ELISA 2^a generación. Por otro lado, no encontramos diferencia entre el porcentaje de pacientes positivos a anticuerpos anti-JC en el grupo de los no tratados con natalizumab analizados con la segunda generación de doble ELISA, 12/17 (70.6%), y los analizados con el test previo 19/39 (48.7%) (χ^2 test, $p=0.13$).

Tabla 20. Número de pacientes positivos para virus JC usando qPCR en orina y una de las dos dobles ELISAS (STRATIFY JCVtm Test: doble ELISA, o STRATIFY JCVTM DxSelectTM: doble ELISA de 2^a generación) en suero.

	Ab JCV - / ADN JCV - (%)	Ab JCV + / ADN JCV - (%)	Ab JCV - / ADN JCV + (%)	Ab JCV + / ADN JCV + (%)
Doble ELISA	34/116 (29,3)	17/116 (14,7)	11/116 (9,5)	54/116 (46,6)
Doble ELISA 2^a gen.	0 (0)	1/12 (8,3)	4/12 (33,3)	7/12 (58,3)

Ab JCV: anticuerpos anti JC; ADN JCV+: detección del ADN de virus JC en orina mediante qPCR.

La carga viral en orina de los 15 pacientes (12%) que sólo fueron positivos con qPCR (2.6 (1.5, 3.5) log₁₀ copies/ml) fue significativamente menor (Mann-Whitney *U* test, $p=0.0002$) que la carga viral de los 61 pacientes positivos con el mismo resultado con ambas técnicas (5 (3.2, 6.6) log₁₀ copies/ml) (figura 26).

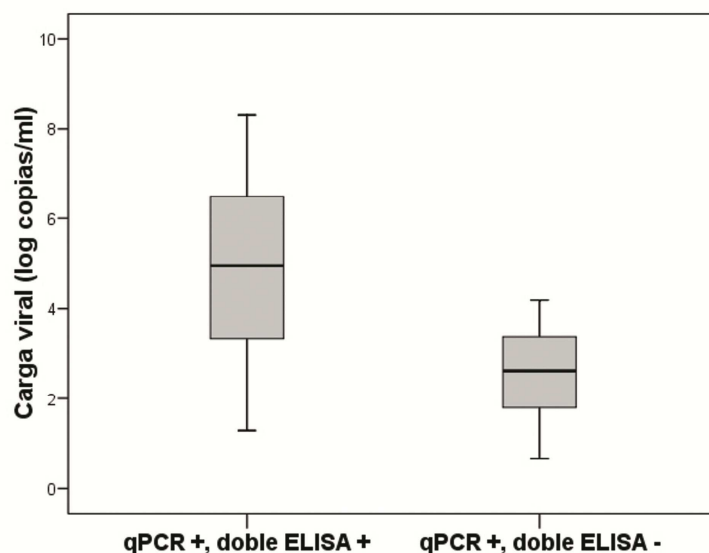


Figura 26. Comparación de la carga viral del virus JC en orina en pacientes con estatus concordante o discordante de qPCR-anticuerpos. Concordante: resultados de qPCR y doble-ELISA positivos (n=61): 5 (3,2, 6,6) log10 copias/ml y discordante resultados para qPCR positivos pero para doble-ELISA negativos (n=15): 2.6 (1.5, 3.5) log10 copias/ml (test de U de Mann-Whitney, $p=0,0002$).

Tampoco hubo diferencias significativas entre la presencia de anticuerpos anti-JC en pacientes tratados con natalizumab y no natalizumab, ni entre la prevalencia del virus JC en orina entre ambos grupos.

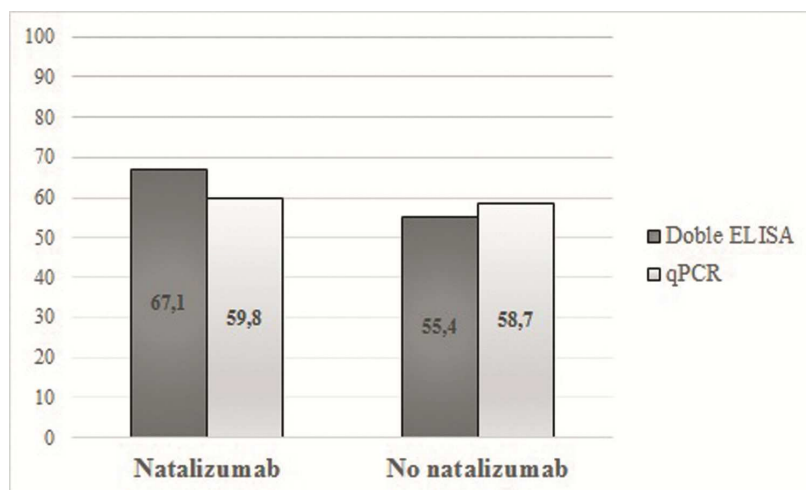


Figura 27. Porcentaje de pacientes positivos para la detección del virus JC usando doble ELISA (detección de anticuerpos anti-JC en suero) o qPCR (detección del ADN viral en orina) de 82 pacientes tratados con natalizumab y 56 no tratados. No hubo diferencia significativa entre estos grupos (test de χ^2).

La presencia de anticuerpos anti-JC y la prevalencia viral en pacientes tratados y no tratados con natalizumab no varió en función del sexo, edad o duración de la enfermedad (datos no mostrados). No encontramos diferencias significativas en lo que respecta a la duración del tratamiento (meses) entre los pacientes positivos a anticuerpos anti-JC y los negativos; ni tampoco entre pacientes con prevalencia positiva del virus en orina negativa y los de positiva. Los pacientes agrupados en función del tratamiento previo al tratamiento con natalizumab tuvieron una tasa de anticuerpos anti-JC positivos y una prevalencia viral en orina similar (tabla 19).

Detectamos ADN viral en PBMCs en 4 pacientes, en los meses 3, 21, 33 y 36 del tratamiento con natalizumab, todos ellos positivos para anticuerpos anti-JC. También detectamos ADN del virus JC en PBMCs de 3 pacientes no tratados con natalizumab, pero sólo detectamos anticuerpos anti-JC en dos de ellos simultáneamente en el tiempo. Ninguno de estos pacientes PBMCs positivos fueron tratados previamente con inmunosupresores, y todos ellos fueron positivos para virus JC en orina. No detectamos el virus JC en muestras de suero en esta cohorte.

En lo que respecta al índice de concordancia entre las dos técnicas de 0,41, se le considera como moderado. Siendo el porcentaje de un 26% de la población en contacto o no con el virus en función de la técnica empleada, similar al publicado por otros autores como Laroni y col. (20.5%)¹⁹² pero superior a otros trabajos como el de Gorelik y col.⁵⁸. Probablemente esta última diferencia se deba a la mayor sensibilidad de nuestra qPCR, entendida como límite de detección más bajo. De hecho, aquellos pacientes en los que detectamos el virus JC mediante qPCR pero no mediante doble ELISA tuvieron una carga viral significativamente menor que aquellos individuos que fueron positivos para las dos técnicas. Sería interesante mirar los títulos de anticuerpos en aquellos pacientes solo positivos con doble-ELISA porque tal vez posean niveles más bajos, existiendo una posible correlación entre carga viral en orina y títulos de anticuerpos anti-JC en suero. En cualquier caso un 27% de la población parece que realmente no ha estado en contacto con el virus, al no detectarlo por ninguna de las dos técnicas. Respecto a aquellos pacientes que son negativos a anticuerpos anti-JC sería adecuado testar los niveles de ADN viral en orina para comprobar si efectivamente no han estado en contacto con el virus.

Hemos detectado ADN viral en muestras de PBMCs tanto en pacientes tratados con natalizumab como en no tratados; luego, no podríamos considerar esta detección como factor de riesgo de desarrollo de LMP. Sin embargo, sí que se ha observado una asociación entre la detección asintomática del ADN de virus JC en sangre de pacientes de EM tratados con natalizumab y la diferenciación de células específicas de virus junto con la estimulación de la respuesta inmune efectora mediada por linfocitos CD8+ ⁶⁵. Sería interesante estudiar la respuesta de estas células en aquellos pacientes que presentan ADN viral en PBMCs frente a los que lo tienen en suero y sus diferencias con respecto a casos de LMP.

2.3 Segunda medida de anticuerpos-anti-JC

Los pacientes que fueron negativos en la primera valoración de anticuerpos anti-JC descrita en el apartado anterior fueron evaluados de nuevo con el doble-ELISA de segunda generación aproximadamente un año después. Con lo que, en 33 de los 138 pacientes participantes en el estudio anterior se midieron en dos puntos distintos en el tiempo la presencia de anticuerpos anti-JC y los niveles de ADN viral en PBMCs/suero/orina simultáneamente.

La tasa de seroconversión positiva fue del 36,4% (12/33). Entre los pacientes que seroconvirtieron, un 25% (5/12) fueron positivos mediante qPCR a virus JC en orina en la primera medida. El porcentaje de seroconversión positiva en los pacientes tratados con natalizumab, 39,1% (9/23), no fue diferente de los no tratados con natalizumab 30% (3/10) (χ^2 test, $p=0.616$). En lo que se refiere a los resultados de la qPCR en esos dos puntos distintos en el tiempo, la tasa de conversión positiva en orina fue de un 27,3% (9/23) y la negativa del 12,1% (4/33). No se detectó ninguna diferencia entre estas tasas en pacientes tratados con natalizumab y los no tratados en la primera medición (tasa de positivos: 27,3% (6/22) vs 33.3% (3/9), tasa de negativos: 13.6% (3/22) vs 11.1% (1/9) $p=.939$). Entre estos 33 pacientes, en la segunda medida uno de los pacientes fue positivo en PBMCs tras 42 meses con natalizumab y 2 en suero tras 42 y 8 meses de tratamiento.

La tasa de seroconversión del 36% descrita en nuestro trabajo fue superior a la publicada previamente ^{58,193}. Lo más probable es que esto se deba a que la detección de

anticuerpos anti-JC en todas las segundas muestras de sangre se llevó a cabo mediante el doble-ELISA de segunda generación más sensible que el anterior ¹⁹⁵, mientras que el análisis de las primeras sangres se realizó con el doble ELISA antiguo, quedando constancia de la mejora de la técnica. No detectamos seroconversión negativa como en estudios previos ¹⁹³ porque únicamente se volvieron a evaluar los pacientes que previamente fueron negativos a anticuerpos anti-JC, aunque sí detectamos conversión negativa en lo que refiere a la detección de ADN viral en orina.

En cualquier caso, en el 25% de los pacientes que seroconvirtieron detectamos el ADN viral en orina en la primera muestras, luego la evaluación del ADN viral en orina sería una técnica complementaria a la detección de anticuerpos en cuanto a la evaluación del porcentaje de la población que está o ha estado en contacto con el virus JC.

2.4 Seroconversión a lo largo de tratamiento con natalizumab en los distintos perfiles de excreción del virus JC en orina

De entre estos 33 pacientes que tuvieron 2 medidas de anticuerpos anti-JC y de niveles de ADN del virus JC en PBMCs, suero y orina con un año de diferencia, 23 participaron en el estudio de reactivación viral, que valoraba los niveles de ADN del virus JC en orina desde una primera VB y posteriormente cada 3 meses, y que nos permitió establecer tres patrones de excreción del virus JC en orina: intermitente, permanente y ausente. Los resultados de estos 23 pacientes se representaron en la tabla 21. De tal forma que, en las filas se comparan los resultados de conversión de anticuerpos anti-JC y ADN viral en orina de negativo a positivo o viceversa entre la primera y segunda medición del estudio descrito en el apartado anterior, pero teniendo en cuenta los resultados obtenidos con ambas técnicas; así, tenemos pacientes que permanecen negativos tanto en la primera como en la segunda medición con ambas técnicas (primera fila), mientras otro grupo de pacientes convierten a positivos sus anticuerpos anti-JC pero sin embargo no se detecta ADN viral en orina mediante qPCR en ninguna de las 2 medidas (fila 3). En las columnas se agrupan a los pacientes según el tipo de excreción del virus en orina, concretamente intermitente o ausente.

Tabla 21. Evolución de la presencia de anticuerpos anti-JC (doble ELISA) y del ADN del virus JC en orina (qPCR) entre la primera medida y la segunda (aproximadamente 1 año después), en función del tipo de excreción del virus en orina: intermitente o ausente a lo largo del tratamiento con natalizumab.

2 medidas doble ELISA/qPCR orina	Estudio reactivación viral en orina		Totales	
	JCV intermitente	JCV ausente	n	%
Ab y ADN permanecen negativos	1	9	10	43,5
Ab y ADN se positivizan	2	0	2	8,7
Ab se positiviza y ADN permanece negativo	3	0	3	13
Ab se positiviza y ADN se negativiza	3	0	3	13
ADN permanece positivo y ab negativo	1	0	1	4,3
ADN se positiviza y ab permanece negativo	3	0	3	13
ADN se negativiza y ab permanece negativo	1	0	1	4,3

Ab: anticuerpos anti-JC, ADN: ADN del virus JC; JCV intermitente; excreción del virus JC en orina intermitente.

Se obtuvo el mismo resultado con ambas técnicas (fila 1 y 2) en un 52,2% (12/23) de los casos. Entre los 10 pacientes negativos usando las dos técnicas en ambas visitas, sólo en uno de ellos detectamos ADN viral en orina de una forma intermitente, y en el resto no lo detectamos. Todos los pacientes con resultados distintos en las dos mediciones en función de la técnica estudiada presentaron el virus de forma intermitente en orina desde la VB. Indicando que tal vez exista una correspondencia entre los niveles de ADN viral y los títulos de anticuerpos anti-JC y que cada tipo de excreción esté ligada a características del sistema inmune que serían interesantes estudiar en un futuro.

Estos resultados apuntarían a sugerir la inclusión de los niveles de ADN viral en orina medidos por qPCR, en el mismo instante que se analizan los anticuerpos anti-JC por doble ELISA, en el algoritmo utilizado actualmente para evaluar el riesgo de LMP. Por un lado, se confirmarían los pacientes realmente negativos y por otro lado, al realizarse un seguimiento periódico, se podría especificar el tipo de excreción viral en orina, que como hemos visto con anterioridad parece ser indicativo de distinta respuesta inmunológica frente al virus y mayor probabilidad de reactivación del virus JC en suero.

3. ESTUDIO DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE EL HLA CLASE II Y LA REACTIVACIÓN DEL VIRUS JC A LO LARGO DEL TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB

HLA clase II	
Diseño	Transversal
Participantes	90 EM NTZ
Variables	Tipaje <i>HLA-DRB1</i> en individuos del estudio de la reactivación del virus JC a lo largo de trat con NTZ (ADN en PBMCs, suero y orina)

Recientemente, se ha establecido una asociación tanto positiva como negativa del HLA con enfermedades infecciosas: malaria ¹⁹⁶, mononucleosis ¹⁹⁷, hepatitis B ¹⁹⁸,.... Por ejemplo, aquellos individuos infectados por el VIH con los alelos HLA B*27 y B*57 tienen un mejor pronóstico, mientras que aquellos HLA B*35-Px positivos tienen un peor pronóstico ¹⁹⁹. Así pues, estudiaremos la posible asociación de los distintos alelos presentes en el locus *HLA-DRB1* con la reactivación del virus JC en PBMCs, suero y orina a lo largo del tratamiento con natalizumab.

La distribución del alelo *HLA-DRB1*15:01* no fue significativamente diferente entre el grupo de pacientes en el que se detectó el virus JC por qPCR, tanto en suero como en PBMCs, y el grupo de pacientes en el que no se detectó (tabla 22); también entre los pacientes con distintos perfiles de excreción del virus en orina (permanente, intermitente y ausente) (datos no mostrados). Lógicamente, al tratarse de un factor de susceptibilidad a EM y padecer todos los individuos esta patología la distribución del alelo *HLA-DRB1*1501* no fue diferente entre los distintos subgrupos.

Tabla 22. Frecuencia del alelo *DRB1*15:01* en los pacientes en los que se detecta el ADN del virus JC por qPCR en suero o en PBMCs alguna vez a lo largo del tratamiento con natalizumab y en los que no se detecta.

	Paciente + alguna vez en suero n=11	Paciente nunca + en suero n=79	OR	p	Paciente + alguna vez en PBMCs n=13	Paciente nunca + en PBMCs n=77	OR	p
<i>DRB1*15:01</i>	6 (54,6)	28 (35,4)	2,19 (0,5, 9,85)	0,19	6 (46,2)	28 (36,4)	1,5 (0,37, 5,78)	0,35

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

Las frecuencias alélicas del loci de HLA de clase II *HLA-DRB1* no fueron diferentes significativamente entre aquellos pacientes en los que detectamos alguna vez el ADN viral mediante qPCR en suero durante el tratamiento, y aquellos en los que no lo detectamos (tabla 23).

Tabla 23. Frecuencia de los alelos *HLA-DRB1* en los pacientes en los que se detecta el ADN del virus JC por qPCR en suero alguna vez a lo largo del tratamiento con natalizumab y en los que no se detecta.

<i>HLA-DRB1</i>	Paciente + alguna vez en suero n=11	Paciente nunca + en suero n=79	OR	p
1	3 (27,3)	14 (17,7)	1,74 (0,26, 8,46)	0,34
2 (15,16)	5 (45,5)	30 (38)	1,36 (0,3, 5,86)	0,43
3 (17, 18)	2 (18,2)	29 (36,7)	0,38 (0,04, 2,06)	0,19
4	3 (27,3)	18 (22,8)	1,27 (0,2, 6,03)	0,5
5 (11,12)	0	8 (10,1)	0	0,34
6 (13,14)	1 (9,1)	2 (2,5)	3,85 (0,06, 78,6)	0,33
7	4 (26,4)	18 (22,8)	1,94 (0,37, 8,62)	0,26
8	0	6 (7,6)	0	0,45
9	1 (9,1)	0	0	0,12

Sin embargo, la frecuencia de uno de los alelos del HLA de clase II estudiado, *HLA-DRB1*07*, fue significativamente mayor ($p=0,01$) en los pacientes en los que detectamos el virus JC en PBMCs (53,9%) frente a los que no (19,5%) (tabla 24).

Tabla 24. Frecuencia de los alelos *HLA-DRB1* en los pacientes en los que se detecta el ADN del virus JC por qPCR en PBMCs alguna vez a lo largo del tratamiento con natalizumab y en los que no se detecta.

<i>HLA-DRB1</i>	Paciente + alguna vez en PBMCs n=13	Paciente nunca + en PBMCs n=77	OR	p
1	4 (30,8)	13 (16,9)	2,19 (0,42, 9,36)	0,21
2 (15,16)	6 (46,2)	30 (39)	1,34 (0,36, 5,04)	0,62
3 (17, 18)	3 (23,07)	28 (36,4)	0,52 (0,09, 2,29)	0,27
4	3 (23,1)	18 (23,4)	0,98 (0,16, 4,4)	0,64
5 (11,12)	1 (7,7)	7 (9,1)	0,83 (0,02, 7,54)	0,67
6 (13,14)	1 (7,7)	20 (26)	0,24 (0,01, 1,83)	0,14
7	7 (53,9)	15 (19,5)	4,82 (1,17, 19,83)	0,01
8	0	6 (7,8)	0	0,38
9	0	1 (1,3)	0	0,85

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

Por último, la frecuencia de los alelos de HLA clase II en estudio no fue diferente entre aquellos pacientes con distinto tipo de excreción viral en orina: permanente, intermitente o ausente (tabla 25).

Tabla 25. Frecuencia de los alelos *HLA-DRB1* en los pacientes en los que se detecta el ADN del virus JC mediante qPCR en orina a lo largo del tratamiento con natalizumab de forma permanente, intermitente y ausente (test de asociación lineal por lineal, $p < 0,05$).

<i>HLA-DRB1</i>	Excreción permanente de JCV en orina n=30	Excreción intermitente de JCV en orina n=46	Excreción ausente de JCV en orina n=13	p
1	8 (26,7)	6 (13,04)	3 (23,1)	0,5
2 (15,16)	8 (26,7)	21 (45,7)	7 (53,8)	0,1
3 (17, 18)	11 (36,7)	17 (37)	3 (23,1)	0,54
4	7 (23,3)	8 (17,4)	5 (38,5)	0,52
5 (11,12)	2 (6,7)	5 (10,9)	1 (7,7)	0,78
6 (13,14)	5 (16,7)	14 (30,4)	2 (15,4)	0,73
7	9 (30)	10 (21,7)	2 (15,4)	0,3
8	3 (10)	2 (4,3)	1 (7,7)	0,6
9	0	1 (2,2)	0	0,78

JCV: virus JC.

El *HLA-DRB1*07* se había asociado previamente a la persistencia en suero del virus de la hepatitis C en individuos seropositivos a dicho virus ²⁰⁰. Nuestros resultados, en cambio, se relacionan con presencia viral en PBMCs, que no siempre se relaciona con detección del virus reactivado en suero. En orina no encontramos diferencias significativas en la frecuencia de los alelos en función del tipo de excreción del virus JC en orina.

Generalmente, los antígenos que son presentados a los linfocitos T CD4+ por las moléculas del HLA clase II son antígenos patógenos del espacio extracelular introducidos al interior celular por endocitosis, y son degradados por proteasas en los endosomas. Mientras que los antígenos presentados por las moléculas del HLA clase I a los CD8+ suelen ser proteínas patógenas (generalmente virales) producidas por la propia célula infectada que son degradadas por los proteasomas. En este caso hubiéramos esperado encontrar relación entre el tipo de HLA clase II y la detección del virus en suero, pues sería indicativo de que existen antígenos virales en el espacio extracelular para procesar y responder ante ellos.

Sin embargo, nosotros hemos encontrado esta relación con la detección del ADN viral en PBMCs. Esto lo podríamos explicar de varias formas:

- 1) La presencia de ADN viral en PBMCs no tiene por qué implicar que el virus está en periodo de latencia; la replicación activa del mismo sin llegar a la lisis de este tipo celular o en un porcentaje muy pequeño ha sido descrita previamente ¹¹⁵. Luego, podrían existir antígenos virales en suero producto de la lisis celular de alguna PBMCs o incluso partículas virales completas, pero en una concentración tan baja, que no llegaríamos a poder detectar su ADN. Estas partículas virales complejas podrían ser presentadas por HLA de clase II de células presentadoras de antígenos. De hecho, en pacientes en los que detectamos el virus JC en suero alguna vez durante el tratamiento este *HLA-DRB1*07* también es más frecuente que en nunca positivos, aunque esta diferencia no alcanza la significación.
- 2) La mayor frecuencia del alelo *HLA-DRB1*07* en el grupo en el que detectamos el virus JC en PBMCs frente al que no lo detectamos, puede ser debida a que este gen esté en desequilibrio de ligamiento con el factor realmente implicado en esta respuesta, por ejemplo algún gen del HLA clase I, que no hemos tipado para este estudio. También puede ser que este desequilibrio de ligamiento se produzca con genes que codifican para componentes del proteosoma (LMP2 y LMP7) ya que se encuentran en la región del HLA clase II.

Una de las limitaciones que tiene este estudio es el pequeño tamaño muestral presentado, con lo cual sería de interés replicarlo en otras poblaciones para descartar la existencia de falsos positivos o negativos, pues estamos ante genes muy polimórficos. Si bien, no sería estrictamente necesario pues la potencia fue del 80%. Igualmente, sería de interés ampliarlo con el estudio de los alelos del HLA clase I, con el fin de determinar si algún haplotipo ancestral está relacionado con la presencia del virus JC en alguno de los compartimentos en estudio, dado el gran desequilibrio de ligamiento entre los distintos alelos de los loci de HLA clase I, también entre los de clase II y entre ambas clases de HLA.

Pese a las limitaciones, este estudio sugeriría que aquellos individuos portadores del *HLA-DRB1*07* estaría probablemente más predispuesto al desarrollo de la LMP que el resto; puesto que se requiere de una respuesta eficaz de los linfocitos T para controlar la infección viral ²⁰¹.

4. ESTUDIO DE LA POSIBLE TRANSACTIVACIÓN DEL VIRUS JC POR EL HHV-6 DURANTE EL TRATAMIENTO CON NATALIZUMAB

TRANSACTIVACIÓN DEL VIRUS JC POR HHV-6	
Diseño	Cohortes abierto: VB, V6, V12, V18, V24
Participantes	77 EM NTZ
Variables	Niveles de IgG e IgM anti-HHV-6 en individuos del estudio de la reactivación del virus JC a lo largo de trat con NTZ (ADN en PBMCs, suero)

Las características inmunosupresoras de natalizumab han provocado la aparición de varios casos de reactivación patológica del virus JC causante de la LMP; sin embargo, este tratamiento no se ha asociado a la aparición de otras enfermedades infecciosas. Este hecho, no excluiría la posibilidad de que este fármaco monoclonal pudiera estar afectando a la reactivación de otros virus latentes, aunque sin alcanzar niveles patológicos. Así pues, debido a la detección de secuencias de ADN de HHV-6A en LCR y al aumento de la frecuencia de anticuerpos anti-HHV-6 en pacientes tratados con natalizumab, frente a otros pacientes de EM no tratados con natalizumab, ciertos autores ¹⁶¹ sugieren que la reactivación del HHV-6 también podría estar asociada a natalizumab, incluso demostraron *in vitro* como el HHV-6 aumentaba significativamente la replicación del virus JC. Así pues, nos propusimos estudiar si la reactivación del HHV-6, medida por niveles de IgG e IgM anti-HHV-6 durante el tratamiento con natalizumab, guarda relación con la reactivación del virus JC a lo largo del tratamiento.

Sin embargo, uno de los efectos del tratamiento con este anticuerpo monoclonal es la disminución generalizada de los niveles de IgG y de IgM a lo largo del tratamiento ²⁰². Por lo tanto, comenzaremos este apartado comprobando si esta disminución afecta también a las IgG e IgM frente al virus HHV-6.

La prevalencia de IgG anti-HHV-6 a lo largo de casi todo el tratamiento fue de un 100%, como se puede apreciar en la tabla 26. En lo que se refiere a la prevalencia de las IgM anti-HHV-6, fue de aproximadamente un 10% en la VB, y aunque existe una tendencia a disminuir durante el tratamiento, no se encontraron diferencias significativas entre las prevalencias de la VB y el resto.

Tabla 26. Prevalencia de las IgG e IgM anti-HHV-6 a lo largo del tratamiento con natalizumab. No existe aumento de la prevalencia de las IgG ni de las IgM frente al HHV-6 entre la VB y el resto de las visitas (McNemar, $p > 0,05$).

Prevalencia	VB	V6	V12	V18	V24
IgG anti-HHV-6	100 (75/75)	97,4 (74/76)	98,6 (71/72)	97,1 (68/70)	98,5 (67/68)
IgM anti-HHV-6	10,4 (8/77)	5,3 (4/76)	2,8 (2/72)	4,3 (3/70)	2,9 (2/69)

VB: visita basal (paciente no tratado); V6: paciente tras 6 meses de tratamiento con natalizumab; HHV-6: Herpesvirus 6. Valores expresado en porcentaje de positivos (pacientes positivos/pacientes totales).

Por otro lado, se produjo una disminución de los títulos en unidades Panbio tanto de las IgG como de las IgM a lo largo del tratamiento (tabla 27). Es de destacar la existencia de dos pacientes con títulos de IgM anti-HHV-6 mayores de 25 unidades Panbio durante todo el tratamiento, incluso durante la VB uno de ellos.

Tabla 27. Títulos de IgG e IgM anti-HHV-6 (unidades Panbio) a lo largo de tratamiento con natalizumab. Existe una disminución significativa de los mismos cuando comparamos la VB con el resto (test de Wilcoxon, $*p < 0,05$ $**p < 0,005$, $***p < 10E-5$).

Títulos	VB	V6	V12	V18	V24
IgG	26,4	24,9	23,5	23,8	22,7
anti-HHV-6	(20, 35,3)	(18,3, 33,8)*	(20, 30,9)*	(18, 32,6)**	(17,2, 30,9)**
IgM	3,3	1,8	1,7	2,1	1,9
anti-HHV-6	(1,9, 5,8)	(1,3, 3,5)***	(1,1, 2,6)***	(1,2, 3,2)***	(1,4, 3,9)***

VB: visita basal (paciente no tratado); V6: paciente tras 6 meses de tratamiento con natalizumab; HHV6: Herpesvirus 6.

Como hemos visto, no detectamos una disminución de la prevalencia de las IgG anti-HHV-6 durante el tratamiento con natalizumab, que permaneció en torno al 100% a lo largo de todo el estudio. Esto se debe a que la primoinfección con el HHV-6 se produce antes de los 3 años de edad en la mayor parte de la población ²⁰³. Tampoco disminuyó de forma significativa la prevalencia de las IgM anti-HHV-6 a lo largo del tratamiento con natalizumab, indicadoras de la presencia de una respuesta inmunológica frente a la reactivación del HHV-6 o de una nueva infección activa; aunque pudimos apreciar una tendencia a la disminución de la misma a medida que las visitas aumentaban.

Por el contrario, si disminuyeron los títulos de IgG e IgM anti-HHV-6 a mayor tiempo de tratamiento con el anticuerpo monoclonal. Pudiendo afirmar que la disminución de Ig generalizada también afectaría al caso concreto de los títulos de las IgG e IgM anti-HHV-6. Si bien, los niveles de IgG anti-HHV-6 en suero en pacientes tratados con natalizumab parecen ser mayores que en pacientes de EM no tratados con el anticuerpo monoclonal ¹⁶¹.

Los títulos de ambos anticuerpos, IgG e IgM anti-HHV-6, parecieron modificarse debido al tratamiento con natalizumab y la prevalencia de las IgG fue cercana al 100%. Así pues, consideramos el haber sido IgM positivo (títulos mayores de 9 unidades Panbio) alguna vez durante el tratamiento con natalizumab, como indicador de una exposición reciente al HHV-6 o de una reactivación de una infección latente durante dicho tratamiento; estos anticuerpos pueden detectarse transcurridos de 9 a 12 meses después de la infección ²⁰⁴. Con lo que cabría esperar que, si existiera una transactivación viral del virus JC por parte del HHV6, en los pacientes positivos a IgM hubiera mayor probabilidad de detectar ADN del virus JC en PBMCs o en suero, y más teniendo en cuenta que ambos virus establecen latencia o pueden replicarse en linfocitos ²⁰⁵.

En la tabla 28 se especifica de entre los individuos que fueron IgM anti-HHV-6 positivos, el porcentaje de los que tuvieron niveles detectables de ADN del virus JC alguna vez durante el tratamiento tanto en PBMCs como en suero, e igualmente se presentan esos mismos porcentajes para aquellos individuos que fueron IgM negativos. La detección del ADN viral de virus JC en PBMCs o suero y de los anticuerpos IgM anti-HHV-6 en los dos pacientes positivos para ambas variables no se produjo en la misma visita, y siempre con más de 12 meses de diferencia.

Tabla 28. Porcentaje de pacientes con ADN de virus JC detectable en PBMCs y suero a lo largo de tratamiento con natalizumab con o sin IgM anti-HHV6 en suero. No existen diferencias significativas entre los grupos en suero ni en PBMCs ni en orina (test de χ^2 , $p>0,05$).

	Suero		PBMCs	
	ADN JCV +	ADN JCV -	ADN JCV +	ADN JCV -
IgM anti-HHV-6 +	1/9 (11,1)	8/9 (88,9)	1/9 (11,1)	8/9 (88,9)
IgM anti-HHV-6 -	1/68 (14,7)	58/68 (85,3)	13/68 (19,1)	55/68 (80,9)

IgM anti-HHV-6 +/-: anticuerpos IgM anti-HHV-6 positivos/negativos; ADN JCV +/-: ADN del virus JC detectado/no detectado (qPCR); PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.

Por otro lado, en ninguno de los dos pacientes positivos para IgM anti-HHV-6 a lo largo de todo el tratamiento con natalizumab detectamos el ADN del virus JC en PBMCs o suero.

El porcentaje de pacientes en los que detectamos el ADN del virus JC alguna vez durante el tratamiento en PBMCs o suero fue parecido entre individuos IgM positivos (al menos una vez durante el tratamiento) y negativos. Ni siquiera en aquellos pacientes positivos a IgM durante todo el tratamiento con el anticuerpo monoclonal se detectó el virus JC. Todo parece indicar que en nuestra cohorte no existe un fenómeno de transactivación entre ambos virus. Si bien, deberíamos de profundizar más en el tema aumentando nuestra cohorte, con otros métodos de detección de una nueva infección o una reactivación del HHV-6, e incluso estudiando este fenómeno en el cerebro, pues es aquí, más en concreto en las lesiones de LMP y sus alrededores, al igual que en los oligodendrocitos intralesionales, donde se ha detectado tanto virus JC como HHV-6

206,207 .

5. VARIANTES DEL VIRUS JC EN PACIENTES CON LMP

ESTUDIO DE LAS VARIANTES DEL VIRUS JC	
Diseño	Cohortes abierto
Participantes	3 EM NTZ: 1 paciente no LMP en el que se detecta ADN del virus JC en PBMCs y/o suero a lo largo de tratamiento con NTZ y 2 pacientes que desarrollaron LMP
Variables	Identificación de variantes del virus JC en LCR, PBMCs, suero y orina

La presencia de la variante neurotrópica del virus JC es un requisito indispensable para el desarrollo de LMP. Varios trabajos se han centrado en este aspecto mediante su identificación en distintos compartimentos: amígdalas ¹³⁶, médula espinal ¹⁴¹, tracto gastrointestinal ²⁰⁸, cerebro ¹⁴²,... y gracias a ellos, se han descrito diferentes variantes neurotrópicas, a parte de las clásicas Mad-1, Mad-4 y Mad-8, con la característica común de presentar distintas combinaciones de deleciones y duplicaciones de los fragmentos (A-B-C-D-E-F1-F2) en los que se ha dividido la RR de la variante arquetípica ^{106,110,151}. Mientras los estudios transversales abundan en este campo, los longitudinales son prácticamente inexistentes o completamente inexistentes en el caso de enfermos de EM tratados con natalizumab. Por ello, nos planteamos el estudio de las variantes del virus JC en 3 pacientes de EM, entre los cuales 2 de ellos desarrollaron LMP, a lo largo del tratamiento con natalizumab.

Los pacientes que participaron en este estudio fueron los siguientes (tabla 29):

P56 (no LMP)

Mujer, diagnosticada de EMRR desde el año 1995 tras un primer brote visual. Fue tratada con IFN-beta-1-a intramuscular antes de comenzar con natalizumab a los 44 años de edad. Tras dos años de tratamiento con dicho anticuerpo monoclonal se le retiró debido a la detección del virus JC mediante qPCR en PBMCs y suero de forma mantenida en el tiempo. Si bien, en esta paciente no se detectó el virus JC en LCR ni tampoco presentó imágenes de RM compatibles con LMP. Desde julio del 2 de 2010 está siendo tratada con AG.

Tabla 29. Características clínicas de los pacientes que participaron en el estudio de las variantes del virus JC: diagnóstico de la EM, tratamientos antes y después de natalizumab, desarrollo de LMP, anticuerpos anti-JC (medidos por doble ELISA), tipaje HLA clase II.

	Diagnóstico de EM	Tratamiento previo NTZ	NTZ	LMP	Tratamiento posterior NTZ	Anticuerpos anti-JC	HLA clase II
P56 (no LMP)	feb-95	09/2003-06/2008: IFN-beta-1-a im, EDSS al Io tto=0, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 2	07/2008-06/2010: NTZ, EDSS al Io tto=3,5, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 2	No	07/2010-actualidad: AG, EDSS al Io tto=4, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 0	04/2011: +	HLA-DRB1*07 HLA-DRB1*04
P1004 (LMP a 2 años de NTZ)	jun-85	06/1992-10/2006: Azatioprina, EDSS al Io tto=0, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 2 01/2007-07/2008: AG, EDSS al Io tto=3,5, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 3	09/2008-06/2010: NTZ, EDSS al Io tto=3,5, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 4	07/2010: Diagnóstico de LMP (LCR +) 09/2010: IRIS	10/2010: AG, EDSS al Io tto=4, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 1	03/2011: +	HLA-DRB1*15:01
P89 (LMP a 4 años de NTZ)	ene-03	06/2005-01/2006: IFN-beta-1-a sc (hepatotoxicidad), EDSS al Io tto=2, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 1 01/2006-08/2008: AG, EDSS al Io tto=2, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 3	09/2008-04/2012: NTZ, EDSS al Io tto=1,5, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 3	05/2012: Diagnóstico de LMP (LCR +) tratada con mefloquina y posteriormente con cidofovir 07/2012: IRIS	10/2012-Actualidad: AG, EDSS al Io tto=4,5, n° brotes previos tto dt 2 últimos años: 1	05/2011: +	HLA-DRB1*07 HLA-DRB1*15:01

AG: acetato de glatiramer; dt: durante; EDSS al Io del tto: puntuación en la escala expandida del estado de discapacidad al inicio del tratamiento; EM: esclerosis múltiple; HLA: antígeno de histocompatibilidad humano; IFN: interferón beta; im: intramuscular; IRIS: síndrome inflamatorio de reconstitución inmune; LCR: líquido cefalorraquídeo; LMP: leucoencefalopatía multifocal progresiva; NTZ: natalizumab; P56: paciente número 56; sc: subcutáneo.

P1004 (LMP a los 2 años con natalizumab)

Varón, diagnosticado de EMRR desde el año 1985. Tras recibir previamente azatioprina y AG comenzó el tratamiento con natalizumab a los 40 años de edad. Transcurridos aproximadamente 23 meses con una buena tolerancia a dicho anticuerpo monoclonal, acudió a la consulta debido a la aparición desde hacía 2 semanas de un cuadro clínico que fue identificado por los facultativos como compatible con LMP, confirmándose tanto por RM como por detección del virus JC en LCR. Inmediatamente después del diagnóstico de LMP el paciente fue sometido a plasmaféresis durante varios días, y se le administró mefloquina para su tratamiento. El desarrollo del IRIS fue confirmado por RM después de un mes y medio desde el diagnóstico de la enfermedad causada por el virus JC. Actualmente este paciente está siendo tratado con AG, y no presenta graves secuelas a nivel clínico tras el padecimiento de la LMP.

P89 (LMP a los 4 años con natalizumab)

Varón, diagnosticado de EMRR desde enero de 2003 tras presentar alteraciones en el miembro inferior derecho. Antes de comenzar el tratamiento con natalizumab en julio de 2008, a los 50 años de edad, recibió IFN-beta-1-a subcutáneo durante sólo 6 meses debido a la aparición de hepatotoxicidad frente al fármaco y, posteriormente, AG. Después de 46 meses con natalizumab este paciente acudió a la consulta por presentar un cuadro clínico compatible con brote, tratado inmediatamente con corticoides pero sin mejora alguna. Tras el estudio de las imágenes de RM y la detección del virus JC en LCR por qPCR se confirmó el desarrollo de LMP. Esta patología fue tratada con mefloquina tras la retirada del fármaco por plasmaféresis, y posteriormente con cidofovir ante la ausencia de respuesta al primer fármaco. Padeció IRIS a los dos meses y medio después de la LMP, y en la actualidad está siendo tratado con AG. Este paciente padece secuelas graves a nivel clínico tras la LMP.

5.1 Estudio de la carga viral a lo largo del tratamiento con natalizumab

Las cargas virales en PBMCS, suero, orina y LCR en una primera VB, a lo largo del tratamiento con natalizumab (trimestralmente) y también tras la interrupción del mismo de cada uno de los pacientes que participaron en este estudio de las variantes del virus JC se detallan en la tabla 30.

Tabla 30. Carga viral (log copias/ml) en PBMCs, suero, orina y LCR del virus JC a lo largo del tratamiento con natalizumab (azul), o sin tratamiento (blanco) o con AG (naranja) en 1 paciente que no desarrolló LMP (P56) y dos que sí lo hicieron (P1004 y P89).

P56 (no LMP)	VB	V1	V3	V6	V9	V12	V15	V18	V21	V24	V24 + 2d	V1 AG	V3 AG	V6 AG								
PBMCs	0	0	0	0	0	0	0,8	1	1,3	1,3	0	0	0	0								
Suero	0	0	0	0	0	0	0	2,2	0	0	-	0	0	0								
Orina	0	0	2,2	3,8	3,1	5,5	2,5	2,4	2,9	3,7	-	2,6	-	-								
LCR	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-								
P1004 (LMP a 2 años NTZ)	VB	V1	V3	V6	V9	V12	V15	V18	V21	V23 Síntomas LMP	LMP + 15d	LMP + 1m	LMP + 1m15d IRIS	LMP + 2m	V1 AG	V3 AG	V6 AG	V9 AG				
PBMCs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	1,9	0,9	-	0	0	0	0	0				
Suero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	0,8	0	-	0	-	0	0	0				
Orina	2	0	3,3	0	0	3,4	2,6	4,9	5	2,8	1,8	-	-	1,8	3,4	0	1,9	3,5				
LCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	1,4	-	0	-	0	-	-	-				
P89 (LMP a 4 años NTZ)	VB	V1	V3	V6	V9	V12	V15	V18	V21	V24	V27	V30	V33	V36	V39	V42	V45	V46 Síntomas LMP	V47	LMP + 22d	LMP + 1m15d	LMP + 2m15d IRIS
PBMCs	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,9	1	0	2,4	1,2	0
Suero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2,4	2	0
Orina	6,5	6,7	7,1	5,3	6,3	5,6	3	6,1	6,4	5,2	6,3	6,1	6,5	5,7	5,3	6,3	5,1	-	3,5	6,7	6,2	5,3
LCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	2,6	0

AG: acetato de glatiramero; d: días; LCR: líquido cefalorraquídeo; LMP: leucoencefalopatía multifocal progresiva; m: meses; P56: paciente número 56; PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; VB: visita basal sin tratamiento; V15: visita tras 15 meses de tratamiento con natalizumab.

En P56 (no LMP) detectamos el virus JC en PBMCs desde V15 a V24 (cuando finaliza el tratamiento con natalizumab), en suero en V18 y en LCR nunca. A partir de la interrupción del tratamiento con el anticuerpo monoclonal y durante el posterior con AG, no volvimos a detectar el ADN del virus JC. Este paciente presentó una excreción viral intermitente en orina durante el periodo de duración de este estudio.

En lo que se refiere a P1004 (LMP a los 2 años con natalizumab), el virus JC no fue detectado ni en PBMCs ni en suero a lo largo del tratamiento con natalizumab antes de que aparecieran los síntomas clínicos de la LMP, momento en el cual fue detectado tanto en LCR como en PBMCs, suero y orina. Transcurridos 15 días del diagnóstico de la LMP, se siguió detectando el virus JC en los 4 compartimentos pero a una concentración menor, exceptuando en las PBMCs donde la carga viral siguió aumentando. Es en este tipo de células donde también se detectó el ADN viral un mes después del diagnóstico de la LMP, a una menor concentración y aun cuando la enfermedad estaba siendo tratada con mefloquina. Tras el desarrollo del IRIS no se encontró más el virus ni en PBMCs ni en suero, tampoco al comienzo del tratamiento con AG. La presencia del virus JC en orina a lo largo de todo el estudio fue intermitente. El virus JC no fue detectado en P89 (LMP a los 4 años con natalizumab) ni en PBMCs ni en suero a lo largo del tratamiento con el anticuerpo monoclonal, exceptuando unos días antes de que aparecieran los síntomas clínicos de la LMP, en V45 y en PBMCs en la visita donde aflora la sintomatología clínica compatible con LMP. Aproximadamente 20 días después del diagnóstico de la LMP detectamos el virus JC a una concentración bastante elevada en PBMCs y suero, e igualmente en LCR, PBMCs y suero un mes más tarde, aunque a concentraciones menores que las previas; excepto en LCR, donde la concentración fue la más elevada detectada hasta el momento, a pesar de la plasmaféresis y del tratamiento con mefloquina y cidofovir. Transcurridos dos meses y 15 días del diagnóstico de la LMP, cuando se produce la confirmación del IRIS por imágenes de RM, el virus ya no fue detectado en los compartimentos mencionados previamente. A diferencia de los otros dos pacientes anteriormente descritos, el virus JC fue detectado de forma permanente en orina durante todas las visitas del presente estudio.

Comenzando por el paciente que no desarrolló la LMP (P56), destacar que la visita en que disminuyó más acusadamente la carga viral en orina, V15, fuera la primera en la que se detectó el virus en PBMCs; haciéndonos pensar en los riñones como posible

lugar de procedencia del mismo, como también parecen apoyar ciertos trabajos científicos previos ⁸². A partir de la interrupción del natalizumab por prevención, ante la presencia del virus JC de forma mantenida en el tiempo, dejamos de detectar el virus en PBMCs y/o suero; al igual que cuando el paciente empezó el tratamiento con AG. De esta forma, parecería lógico establecer una asociación entre la reactivación viral y el tratamiento con natalizumab, al menos en este paciente en concreto. Señalar que, tras el tipaje del HLA clase II, este pacientes resultó ser *HLA-DRB1*07*, el alelo que describimos más asociado a la reactivación del virus JC en PBMCs, y que por lo tanto parece tener una peor respuesta inmunológica a la presencia viral. Aun así, sería interesante un estudio más en profundidad de su sistema inmune, pues a diferencia del resto de pacientes no LMP detectamos el virus de forma mantenida en el tiempo y no esporádica.

Con respecto a los pacientes que desarrollaron LMP, tanto en P1004 (LMP a los 2 años) como en P89 (LMP a los 4 años), detectamos el virus JC de forma simultánea a los primeros síntomas clínicos de la LMP; en el caso de P89, unos días antes del diagnóstico por detección viral en LCR. Estos resultados apuntarían a la utilidad de llevar un seguimiento del virus en PBMCs y suero en torno a los 2 años de tratamiento (cuando el riesgo a padecer LMP parece aumentar); puesto que un diagnóstico precoz, acompañado de la consecuente retirada del fármaco y reconstitución del sistema inmune, es beneficioso para el control de la LMP ²⁰⁹. Este seguimiento debería ser bimensual o trimestral, tiempo medio del desarrollo de la LMP.

Parece existir una cierta relación entre la persistencia del virus en los distintos compartimentos de estudio así como de la carga viral con la sintomatología y secuelas de la LMP. De tal forma que, la LMP desarrollada por el paciente P89 con cargas virales más elevadas de forma persistente fue bastante más severa y con peores secuelas que la de P1004. Esto parece lógico, pues a mayor carga viral, mayor tasa de multiplicación del virus JC en las células infectadas en el SNC, y por lo tanto, mayor daño neurológico en las zonas afectadas. De cualquier forma, establecer una relación entre carga, presencia viral y clínica sería un poco arriesgado, pues únicamente presentamos 2 casos de LMP. Si bien, en estudios previos con pacientes de VIH si encontraron una correlación entre elevada carga viral en LCR en el momento del diagnóstico de la LMP y menor tiempo de supervivencia del paciente ^{210,211}. En la peor respuesta del paciente P89 frente al virus JC, también podría estar implicado el hecho de que posee el alelo *HLA-DRB1*07*, que como hemos visto con anterioridad parece estar

relacionado con aquellos pacientes que presentan el virus JC en PBMCs, indicando una posible respuesta inmune celular menos eficaz frente al virus.

Sin embargo, sí parece más evidente, coincidiendo con estudios previos ⁶³, que el diagnóstico del IRIS en ambos pacientes (por imágenes de RM) estuvo acompañado de la desaparición del virus en los compartimentos de estudio, exceptuando en orina, y de la mejora de la sintomatología clínica debido a la reconstitución del sistema inmune.

5.2 Identificación de las variantes del virus JC presentes durante el tratamiento con natalizumab

Continuamos con un estudio pormenorizado de los tipos de variantes del virus JC en PBMCs, suero, orina y LCR de estos tres pacientes en las distintas visitas indicadas en la tabla 12, mediante técnicas de clonación y secuenciación de la RR del virus amplificada previamente (tabla 31).

Los 165 clones secuenciados de la RR del virus JC procedente de P56 (no LMP) fueron todos arquetípicos. Tanto cuando la RR fue amplificada del ADN viral extraído en la VB, V12 y V24 de orina como cuando se extrajo de PBMCs y suero en la V24. Únicamente se identificó una mutación puntual (ver tabla 31) en el fragmento D identificada en un 33,3% de los clones procedentes del ADN viral extraído en la orina de la VB.

De los 303 clones analizados de la RR del virus JC procedentes de P1004 (LMP a los 2 años), los de orina fueron de la variante arquetípica, tanto en la VB (un 44% con delección de dos nucleótidos en el fragmento D), como en la V12 (un 15% con una sustitución puntual en el fragmento D), en la V24 o en la V24 más 15 días. La variante neurotrópica identificada presentó una delección de 43 pb (pares de bases) en el fragmento D, y fue detectada únicamente durante la V24 (momento de diagnóstico de la LMP), en un 10%, 98% y 4% de los clones identificado en LCR, PBMCs y suero respectivamente. Transcurridos 15 días del diagnóstico de la LMP la variante identificada fue de nuevo la arquetípica en LCR, PBMCs (todas con una sustitución puntual en C) y suero (el 100% con la presencia de una delección de una C y una sustitución de C por T en el fragmento C).

Tabla 31. Variantes del virus JC identificadas durante el tratamiento con natalizumab en LCR, suero, PBMCs y orina de 3 pacientes (P56, P1004 y P89).

P56 (No LMP)					P1004 (LMP a 2 años con natalizumab)					P89 (LMP a 4 años de natalizumab)				
MUESTRA	V	SECUENCIA	N	%	MUESTRA	V	SECUENCIA	N	%	MUESTRA	V	SECUENCIA	N	%
VB Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	33	67	VB Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	23	57	VB Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	30	100
	Arq:D*134A-G	ORI-A-B-C-D*-E-F1-F2	33			arq	ORI-A-B-C-d(230,231)-E-F1-F2	43			N1	ORI-A-B-C(1)-E-F1-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	25	100
V12 Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	44	100	V12 Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	39	85	V45 PBMCs	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	37	100
V24 PBMCs	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	30	100		Arq:D*154G-A	ORI-A-B-C-D*-E-F1-F2	15		V45 Suero	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	33	100
V24 Suero	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	32	100	V24=LMP LCR	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	42	69	V47=LMP LCR	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	34	9
V24 Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	26	100		Arq:C*119C-T	ORI-A-B-C*-D-E-F1-F2	21			N3	ORI-a(42)-B-C-d(125-189)-E-F1-F2	21	
						N	ORI-A-B-C-d(145-188)-E-F1-F2	10			N1	ORI-A-B-C(1)-E-F1-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	53	
					V24=LMP PBMCs	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	40	3		N2	ORI-A-B-C(1)-E-f1(148-185)-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	18	
						N	ORI-A-B-C-d(145-188)-E-F1-F2	98		V47=LMP Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	20	100
					V24=LMP Suero	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	26	96	LMP+22d PBMCs	N4	ORI-A-B-C(1)-E-C(1)Ins-E-F1-F2	31	26
						N	ORI-A-B-C-d(145-188)-E-F1-F2	4			N1	ORI-A-B-C(1)-E-F1-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	26	
					V24=LMP Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	27	100		N2	ORI-A-B-C(1)-E-f1(148-185)-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	48	
					LMP+15d LCR	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	32	100	LMP+22d Suero	N3	ORI-A-B-C-d(125-189)-E-F1-F2	28	4
					LMP+15d PBMCs	Arq:C*95G-A	ORI-A-B-C*-D-E-F1-F2	23	100		N1	ORI-A-B-C(1)-E-F1-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	14	
					LMP+15d Suero	Arq:C*112C-T	ORI-A-B-c*(127)-D-E-F1-F2	22	100		N2	ORI-A-B-C(1)-E-f1(148-185)-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	82	
					LMP+15d Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	28	100	LMP+22d Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	42	100
										LMP+1m15d LCR	N3	ORI-A-B-C-d(125-189)-E-F1-F2	29	7
											N1	ORI-A-B-C(1)-E-F1-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	93	
										LMP+1m15d PBMCs	N5	ORI-A-B-c(95-127)-d*(128-159)-E-F1-F2	38	3
											N2	ORI-A-B-C(1)-E-f1(148-185)-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2	97	
										LMP+1m15d Suero	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	25	100
										LMP+1m15d Orina	Arq	ORI-A-B-C-D-E-F1-F2	35	100

La variable Arq se presenta dividida en 7 fragmentos: ORI-A-B-C-D-E-F1-F2¹⁰⁵. Siguiendo la notación de Reid y col.¹¹⁰ las letras mayúsculas en el patrón de RR representan la coincidencia perfecta con la secuencia de ese mismo fragmento de la arquetípica modelo¹⁰⁵, mientras que una letra minúscula indica la existencia de una delección en ese fragmento [d(125-189): existe una delección en el fragmento D, desde el nucleótido 125 al 189)] y un asterisco una sustitución puntual (D*134A-G: existe una sustitución de una A por una G en el nucleótido 134 presente en el fragmento D). Las distintas variables neurotrópicas identificadas (N, N1, N2,...) consisten en reordenamientos de los fragmentos de la arquetípica. El fragemento C(1) equivale a 125G-A, 127C-A, 124-125InsC, donde 124-125InsC indica la inserción de una C entre los nucleótidos 124 y 125. La N indica el número de clones secuenciados y el %, el porcentaje de cada variable detectada en esa visita. A: adenina; Arq: arqueípica; C: citosina; D: días; G: guanina; LCR: líquido cefalorraquídeo; LMP: leucoencefalopatía multifocal progresiva; m: meses; PBMCs: células mononucleares de sangre periférica; RR: región reguladoras; T: timina; VB: visita basal sin tratamiento; V12: visita tras 12 meses de tratamiento con natalizumab.

Se secuenciaron 480 clones procedentes del ADN de P89 (LMP a los 4 años) durante las distintas visitas a lo largo del tratamiento, identificando la variable arquetípica en todas las muestras de orina analizadas. En una de las visitas trimestrales, V45, se detectó el virus mediante qPCR en PBMCs y suero. Posteriormente, al ser clonado y secuenciado, fue en PBMCs donde se detectó, en el 100% de los clones analizados, una primera variante neurotrópica: ORI-A-B-C(1)-E-F1-f2(205-2016)-C(1)-E-F1-F2 que denominamos N1. A diferencia de la arquetípica, N1 carece de fragmento D, el fragmento C-E-F1-F2 se ha duplicado, y en la primera duplicación observamos una delección de 11 nucleótidos en F2. Además, el fragmento C tiene 2 mutaciones puntuales y la inserción de un nucleótido, por ello hemos pasado a denominarle C(1).

Aproximadamente un mes después, en V47, se produjo el diagnóstico la LMP mediante la detección del ADN del virus JC en LCR mediante qPCR y por las imágenes de RM. Posteriormente, cuando este ADN viral de LCR fue clonado y secuenciado identificamos de nuevo la variante neurotrópica N1 (53%) y 2 nuevas: N2 (18%) y N3 (21%), además de la variante arquetípica (9%). Como podemos apreciar en la tabla 31, N2 y N1 son bastante parecidas, salvo que en la primera también se han delecionado 40 nucleótidos del fragmento F1. Mientras que N3 está más próxima de la arquetípica, pues únicamente tiene una delección de 64 nucleótidos en el fragmento D y otra de un nucleótido en el fragmento A, sin que encontremos duplicaciones en su secuencia.

Pasados unos 20 días tras el diagnóstico de la LMP contamos también con muestra de PBMCs y suero. En la primera detectamos la variante N1 en un 26% de los clones, la N2 en un 48% y la N4 en un 26%. La variante N4 carece del primer fragmento F1-F2 con respecto a la N1, y además existe una inserción de 7 aminoácidos en el segundo fragmento C. En el suero de esta misma visita identificamos la variante N1 (14%), la N2 (82%) y la N3 (4%).

En las PBMCs de la última visita analizada, tras mes y medio después del diagnóstico de la LMP, encontramos la variante N2 en un 97% de los clones y la N5 en un 3%. La nueva variante N5 sigue la estructura de la arquetípica pero con dos delecciones, la primera de 32 nucleótidos en el fragmento C y la segunda de 31 nucleótidos en el fragmento D, donde también se detectó una mutación puntual. En el LCR se detectaron las variantes neurotrópicas N1 (93%) y N3 (7%), mientras que en suero todas fueron arquetípicas.

Señalar, que todas las mutaciones puntuales identificadas en los tres pacientes, a excepción de una en C(1), han sido transiciones, es decir, una base púrica (A o G) fue sustituida por otra base púrica (G o A), o una base pirimidínica (C o T) fue sustituida por otra del mismo tipo (T o C). Aunque estas mutaciones en un principio podrían no tener mayor importancia, debido a las altas tasas de mutación características de los virus, pudiera ser que tuvieran lugar a las regiones de unión de los distintos factores de transcripción del hospedador, modificándolas y consecuentemente alterando la capacidad de multiplicación del virus. Por ejemplo, el sitio de unión de Spi-B a las variantes Mad-1/Mad-4 se diferencia del de la arquetípica en un único nucleótido (G en Mad-1/Mad-4 frente a T en la arquetípica) ²¹².

En P56 no se identificó ninguna variante neurotrópica ni en suero, ni en PBMCs ni en orina a lo largo del tratamiento con natalizumab. Con lo cual, este individuo no llegó a desarrollar LMP, pues la variante arquetípica no tiene la capacidad de reproducirse en la glía del SNC como la neurotrópica ^{115,213,214}. Resulta prácticamente imposible saber, si en caso de haber seguido con el tratamiento el paciente hubiera desarrollado LMP. En cualquier caso, habría seguido un perfil diferente a P1004 y P89, donde no se detectó la variante arquetípica en suero y PBMCs de forma mantenida en el tiempo mucho antes de que los síntomas clínicos de la LMP comenzaran a manifestarse; únicamente durante o después de la LMP, cuando la enfermedad estuvo bajo control gracias a la reconstitución del sistema inmune.

Las variantes neurotrópicas identificadas en P1004 (LMP a los 2 años con natalizumab) y P89 (LMP a los 4 años) no coincidirían con las variantes más frecuentemente identificadas en individuos con LMP VIH positivos (Mad-1, Mad-4, Mad-8...) ⁹⁸ y clasificadas en los 4 tipos (IS, IR, IIS y IIR) según Jensen y col. ⁹⁷. Más bien, consistirían en variaciones de éstas producidas por un patrón de duplicación y delección algo distinto de los fragmentos en los que se divide la arquetípica, como ya ha sido descrito por otros autores ^{106,110}. En P1004 únicamente encontramos un tipo de variante neurotrópica con una delección de parte del fragmento D, mientras que en P89 identificamos 5 variantes distintas con reordenamientos respecto a la arquetípica que implican fenómenos de duplicación y delección. La LMP desarrollada por cada uno de estos pacientes también fue diferente, pues en P1004 fue menos severa y duradera que en P89. Tal vez, el hecho de que en el primero la LMP tuviera mejor pronóstico que en

el segundo está relacionado con el tipo de variantes identificadas en ambos pacientes. Las identificadas en P89 más próximas a los subtipos de Mad descritos con anterioridad y posiblemente con mayor potencial de multiplicación en la glía del SNC que la de P1004. Esta relación debería ser confirmada mediante el estudio de más pacientes, pues otros autores defienden hipótesis distintas. Sala y col.¹⁰⁶ compararon las RR de pacientes con LMP asociados a SIDA y tratados con TARGA de buen pronóstico (5 pacientes) y mal pronóstico (5 pacientes), y no concluyeron que existieran entre las variantes identificadas algunas específicas de cada subgrupo de pacientes. Mientras que otros autores²¹⁵ correlacionaron la presencia de mayor número de repeticiones en tándem de determinados fragmentos de la RR con un mejor pronóstico de la LMP en pacientes VIH positivos.

Todas las variantes analizadas en orina fueron arquetípicas, tanto en los dos pacientes que desarrollaron la LMP (P1004 y P89), como en el que detectamos una reactivación del virus JC sin llegar a desarrollar la patología (P56). Esto nos llevaría a pensar que el virus que se haya latente en los riñones es excretado y sigue su ciclo vital sin alteración alguna a lo largo del tratamiento e incluso durante la LMP, refiriéndonos al tipo de variante detectada. Podríamos entonces desechar la hipótesis de que la variante neurotrópica mute en las células epiteliales de los túbulos renales donde parece replicarse el virus JC¹³³ y que de aquí se propague al SNC, como defiende la hipótesis arquetípica^{216,217}. Si bien, en los riñones de otros pacientes con LMP de un trabajo previo, sí ha sido detectada la variable neurotrópica²¹⁸.

Las variantes encontradas en las muestras de PBMCs, suero y LCR extraídas en la misma visita tanto de P1004 (LMP a los 2 años) como de P89 (LMP a los 4 años) se corresponden; es decir, encontramos que los tres compartimentos comparten los mismos tipos de variante neurotrópicas en una misma visita. Al igual que Reid¹¹⁰ creemos que estos resultados apoyarían la hipótesis de que el virus reordenado se propaga de un compartimento a otro. Si bien es cierto, que entre los distintos compartimentos se podrían establecer diferencias de carácter cuantitativo. Con cuantitativo nos referimos a que, en las PBMCs de ambos pacientes sería donde mayor porcentaje de variantes neurotrópicas encontramos frente al suero o LCR. Con respecto a la diversidad, en P89 (LMP a los 4 años) el compartimento donde identificamos más variables neurotrópicas con mayor número de mutaciones en la misma visita, sería en PBMCs, frente a suero o LCR.

Es la primera vez que se realiza un estudio longitudinal de las variantes del virus JC en pacientes de EM tratados con natalizumab, donde la RR del virus ha sido clonada y secuenciada antes durante y después de la LMP. Con la nueva información aportada por este trabajo, intentaremos completar la ya existente acerca de dos cuestiones con gran controversia en la literatura:

1. Determinación del tipo de variante reactivada de su estado latente en condiciones de inmunosupresión y causante posteriormente de la LMP: la neurotrópica o la arquétipica que posteriormente mutará a la neurotrópica.
2. Procedencia de la variante neurotrópica: la o las variantes neurotrópicas, procedentes o no de la arquétipica, podrían estar latentes en el cerebro o alcanzarlo tras ser transportadas en los linfocitos B.

Comenzaremos abordando la primera cuestión. La variante arquétipica se identificó junto a la neurotrópica en todos los compartimentos de estudio (LCR, PBMCs y suero) en el momento de diagnóstico de la LMP del paciente P1004 (LMP a los 2 años) y únicamente la arquétipica en estos mismos compartimentos después de dicho diagnóstico. Esto nos llevaría a pensar que, o bien la neurotrópica procede de la arquétipica, o ambas estaban presentes en el órgano de latencia. Siendo menos probable que la arquétipica provenga de la neurotrópica, al carecer esta última de material genético para generar ciertos fragmentos que ella no posee pero sí la arquétipica, como el D en caso de P1004. Si bien ciertos autores defienden que estos fragmentos exclusivos de la arquétipica podrían proceder del material genético del hospedador ¹¹¹, el proceso sería mucho más complejo. Igualmente, detectamos ambas variantes en P89 (LMP a los 4 años) en el LCR de la visita diagnóstico de la LMP, o un mes y 15 días después, cuando identificamos la arquétipica en suero pero las neurotrópicas en PBMCs y LCR.

Por otro lado, nuestros datos también podrían reflejar la existencia a lo largo del tiempo de una evolución de las secuencias de las variantes detectadas en P89. De tal forma que, mientras en V45 sólo detectamos N1 en PBMCs y la arquétipica en suero, unos meses después, en LCR, identificamos la arquétipica y N1, pero también N2 y N3. Basándonos en estudios previos y en nuestros resultados de P1004 y P89, especularemos sobre un posible patrón de mutación de dichas variables detectadas en el paciente P89. Así pues, Reid y col. ¹¹⁰ describieron que un 92% (12/13) de los pacientes de LMP tratados con natalizumab de los que secuenciaron las RR de virus JC procedentes de LCR y sangre,

tenían el fragmento D total o parcialmente delecionado; a su vez, el segmento B también lo encontraron delecionado en la mayor parte de las ocasiones; y concluyeron que, según sus resultados, los procesos de delección precederían a los de duplicación. Estas observaciones concordarían con los reordenamientos de la RR observados en pacientes de SIDA con LMP ¹¹². Así pues, podríamos establecer que, primeramente, tendría lugar la delección del fragmento D de la secuencia arquetípica; siendo ésta la única mutación identificada en P1004. A continuación, se produciría la duplicación de C-E-F1-F2; posteriormente, la delección parcial de la primera F2, luego la de F1 y F2 y finalmente la delección completa de F1 y F2, llegando a una variante próxima a Mad-1. Esto nos llevaría a plantearnos la posibilidad de que, en vez de que este virus posea varias cepas latentes que se reactivaran en condiciones de inmunosupresión, poseyera una tendencia a mutar hacia las formas neurotrópicas con más ventajas replicativas, tal vez partiendo de la variante arquetípica ¹³³. Esto explicaría que Mad-1, Mad-8, Mad-4, hayan sido detectadas frecuentemente en varios estudios, pues poseen ventajas replicativas al presentar más lugares de unión de los factores de transcripción que la arquetípica ²¹⁴, pero no en todos ^{106,110}. El modelo de mutación aquí presentado podría ser válido para este caso concreto pero la generalización del mismo precisaría de más estudios longitudinales.

Si bien nosotros nos inclinamos más a la procedencia de la neurotrópica a partir de la arquetípica por los motivos anteriormente expuestos, no podríamos descartar con estos resultados otras posibilidades. Como por ejemplo que, inmediatamente después de la primoinfección, presumiblemente con la arquetípica ¹¹¹, se produjeran las neurotrópicas que establecerían latencia en distintos órganos y que se reactivarían en caso de inmunosupresión, siendo esta opción compatible con el modelo de mutación anteriormente expuesto. O, como otros autores defienden, la posible existencia de un fenómeno de superinfección. Es decir, que un individuo infectado por una de las formas del virus (arquetípica) fuera superinfectado con posterioridad por otra (en este caso otra neurotrópica).

Con respecto a la segunda cuestión, sobre la posible procedencia del virus, comenzaremos planteando aquellas hipótesis derivadas de la administración de los anticuerpos monoclonales con los que se han relacionado la aparición de la LMP. El natalizumab moviliza a células CD34+ y células pre-B, ambos sitios de latencia del virus JC ²¹⁹ al torrente circulatorio, esto explicaría la gran cantidad y diversidad de

variantes neurotrópicas detectadas en PBMCs, podría ser en estas células donde el virus esté multiplicándose y luego siendo transportado hacia el SNC. De hecho, se ha propuesto que el reordenamiento de la RR tenga lugar en los linfocitos B, pues poseen las enzimas Rag1 y Rag2 para el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas ²²⁰. Por otro lado, en la médula espinal no se ha encontrado la variante arquetípica en individuos no LMP, sólo la neurotrópica ¹⁴¹, mientras que en individuos LMP ambas variantes han sido detectadas ¹⁵³. Tal vez se precise de una reactivación de la arquetípica previa para que las otras neurotrópicas se multipliquen; de tal forma que, sólo aquellos individuos con las dos variantes en médula tendrían posibilidad de desarrollar la LMP en caso de ser tratados con este tipo de fármacos, o simplemente se requieran más estudios que permitan localizar la variante arquetípica en médula de individuos no LMP. Nosotros encontramos ambas variantes en PBMCs así que no podríamos descartar esta opción.

Por otro lado, también sería razonable pensar que existan varios modelos del proceso de reactivación viral en función de la naturaleza de la inmunosupresión y de factores específicos de cada paciente relacionados con el sistema inmune. Así, White y col. ¹⁴⁶ proponen que en pacientes jóvenes que están recibiendo anticuerpos monoclonales la movilización del virus JC hacia el cerebro desde la periferia sería importante, mientras que en el caso de los pacientes más mayores (al menos 63 años) el virus podría estar ya dentro del cerebro. P1004 y P89, tienen 39 y 50 años respectivamente cuando empiezan el tratamiento con natalizumab, con lo que según estos autores sería más probable la primera opción. Así mismo, la variante arquetípica del virus JC detectada en PBMCs y suero en P56 (no LMP) podría proceder de los riñones. El virus estaría replicándose en este órgano y siendo excretado por la orina; pero también podría unirse a las estructuras de ácido siálico presente en la superficie de los linfocitos B de este órgano, y ser introducido a su interior mediante fagosomas ¹⁴⁶, entrando así en la circulación sanguínea. Esto explicaría que cuando existe presencia del virus tanto en PBMCs como en suero, la carga viral en orina disminuya y que simultáneamente detectemos el virus JC en PBMCs pero no en suero, puesto que en un principio estaría replicándose sin la existencia de lisis celular o siendo ésta muy reducida.

Son muchas las lagunas existentes en nuestro conocimiento sobre la biología del virus JC, sobre todo en lo que se refiere a la forma de transmisión del virus, naturaleza y sitios de latencia, mecanismo de reactivación viral en caso de LMP,... Pero con este

primer estudio longitudinal en tres pacientes tratados con natalizumab podríamos concluir varios aspectos. 1) La existencia de 2 variantes: una arquetípica, que estaría presente siempre en orina y que no parece revestir mayor riesgo, incluso cuando es detectada en sangre o/y suero; y otras neurotrópicas, consistentes en un reordenamiento de la anterior (deleciones de elementos de control negativo y/o duplicaciones de elementos de control positivo) que son más activas a nivel patogénico, pudiendo infectar células gliales y causar LMP. 2) El compartimento donde detectamos mayor número de variantes neurotrópicas fue las PBMCs, siendo aquí donde probablemente tenga lugar la mayor parte de las mutaciones de la arquetípica a la neurotrópica o tal vez de neurotrópicas reactivadas. Entre estas PBMCs probablemente encontraríamos células CD34+ y pre-B, sitios de latencia del virus JC, además de ser movilizadas por el natalizumab como ha sido descrito en estudios previos ¹¹¹. Esta movilización de células hematopoyéticas es compartida por la mayoría de los anticuerpos monoclonales relacionados hasta el momento con el desarrollo de LMP, y ayudaría entender la exclusividad de este fármaco inmunosupresor para reactivar concretamente este virus y no otros que también podrían reactivarse de su estado de latencia al ser tratados con inmunosupresores.

VI CONCLUSIONES

1. Definimos tres patrones de excreción del virus JC en orina de pacientes tratados con natalizumab: permanente, intermitente y ausente, siendo en el segundo grupo donde la carga viral es significativamente más baja, pero donde apreciamos un incremento estadísticamente significativo de la misma y de la prevalencia a lo largo del tratamiento con natalizumab.
2. Detectamos el virus JC en PBMCs y/o suero alguna vez durante el tratamiento con natalizumab en un 23% de nuestra población, detectándose el ADN viral en suero con mayor frecuencia en los pacientes con una excreción intermitente del virus en orina, frente a los de excreción permanente, posible indicador de la existencia de una respuesta inmune distinta frente al virus entre ambos grupos.
3. La tasa de seroprevalencia de anticuerpos anti-JC (62,3%) y la prevalencia del virus en orina (59,4%) son similares en nuestra población de EM; ninguno de los dos parámetros parece modificarse en función de las distintas variables clínicas estudiadas, si bien sí se identifica una tendencia al aumento de la seroprevalencia, al igual que de la carga viral en orina, a edades más avanzadas, lo que justificaría el seguimiento de ambos parámetros durante el tratamiento.
4. La concordancia entre los resultados de las dos técnicas estudiadas, qPCR y doble ELISA, es moderada, de tal forma que un 26% de nuestra población habría estado en contacto o no con el virus JC en función de la técnica utilizada. Por ello, consideramos que sería de utilidad evaluar en los pacientes negativos para anticuerpos anti-JC los niveles de ADN de virus JC en orina con qPCR, para asegurarnos del no contacto previo con el virus JC.
5. La tasa de seroconversión positiva de anticuerpos anti-JC es de un 36%, más elevada que la ya publicada.
6. Parece existir cierto componente genético en la respuesta frente al virus JC, de tal forma que los individuos con el alelo *HLA-DRB1*07* posiblemente tendrían un peor pronóstico en caso de LMP, si bien estos resultados deberían ser replicados en cohortes independientes.

7. Nuestros datos no apoyan una posible transactivación del virus JC por parte del HHV-6, ya que los patrones de reactivación de ambos virus durante el tratamiento con natalizumab no están relacionados.

8. Las variantes encontradas en el paciente que no desarrolló LMP son todas arquetípicas, pudiéndose establecer en este paciente en concreto una relación directa entre presencia de virus JC en PBMCs y suero y administración de natalizumab, pues tras la retirada del fármaco no vuelve a observarse presencia del virus en ninguna de las muestras analizadas.

9. En los dos pacientes de EM que desarrollaron LMP detectamos la variante neurotrópica del virus prácticamente de forma simultánea al comienzo de los síntomas clínicos de LMP, pudiéndose establecer una relación entre la clínica de la LMP desarrollada y el tipo de variante identificada: en el paciente con la patología menos agresiva se identificó una sola variante neurotrópica con un solo fragmento deleciónado, mientras que en el otro paciente con una LMP de peor pronóstico se identificaron diversas variantes neurotrópicas con distintos patrones de deleciones y duplicaciones.

10. En nuestros dos casos de LMP el virus JC parece replicarse activamente en las PBMCs, donde encontramos un mayor número de variantes neurotrópicas que se originarían mediante el reordenamiento de los distintos fragmentos que componen su RR, teniendo lugar primero los fenómenos de deleción, y luego los de duplicación.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. Otero-Romero, S, Roura, P, Sola, J, et al. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler*. 2013; 19:245-248.
2. Compston, A and Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 372:1502-1517.
3. Poser, CM, Paty, DW, Scheinberg, L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983; 13:227-231.
4. McDonald, WI, Compston, A, Edan, G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001; 50:121-127.
5. Lublin, FD and Reingold, SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996; 46:907-911.
6. Kurtzke, JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983; 33:1444-1452.
7. Fischer, JS, Rudick, RA, Cutter, GR, et al. The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force; 87a. *Mult Scler*. 1999; 5:244-250.
8. Weinshenker, BG. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 1996; 14:291-308.
9. Ebers, GC and Sadovnick, AD. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol*. 1994; 54:1-17.
10. Oksenberg, JR, Seboun, E, and Hauser, SL. Genetics of demyelinating diseases. *Brain Pathol*. 1996; 6:289-302.
11. Koch-Henriksen, N and Sorensen, PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol*. 2010; 9:520-532.
12. Rosati, G. Descriptive epidemiology of multiple sclerosis in Europe in the 1980s: a critical overview. *Ann Neurol*. 1994; 36 Suppl 2:S164-S174.
13. Grabbe, S, Varga, G, Beissert, S, et al. Beta2 integrins are required for skin homing of primed T cells but not for priming naive T cells. *J Clin Invest*. 2002; 109:183-192.
14. Willer, CJ, Dymment, DA, Risch, NJ, et al. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:12877-12882.

15. Mumford, CJ, Wood, NW, Kellar-Wood, H, et al. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology*. 1994; 44:11-15.
16. Ristori, G, Cannoni, S, Stazi, MA, et al. Multiple sclerosis in twins from continental Italy and Sardinia: a nationwide study. *Ann Neurol*. 2006; 59:27-34.
17. Haines, JL, Terwedow, HA, Burgess, K, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet*. 1998; 7:1229-1234.
18. Svejgaard, A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics*. 2008; 60:275-286.
19. Muller-Hilke, B and Mitchison, NA. The role of HLA promoters in autoimmunity. *Curr Pharm Des*. 2006; 12:3743-3752.
20. Traherne, JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet*. 2008; 35:179-192.
21. Horton, R, Wilming, L, Rand, V, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004; 5:889-899.
22. Haines, JL, Ter-Minassian, M, Bazyk, A, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet*. 1996; 13:469-471.
23. Hillert, J and Olerup, O. HLA and MS. *Neurology*. 1993; 43:2426-2427.
24. Hafler, DA, Compston, A, Sawcer, S, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007; 357:851-862.
25. Dean, G and Kurtzke, JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J*. 1971; 3:725-729.
26. ALTER, M, HALPERN, L, KURLAND, LT, et al. Multiple sclerosis in Israel. Prevalence among immigrants and native inhabitants. *Arch Neurol*. 1962; 7:253-263.
27. Detels, R, Visscher, BR, Malmgren, RM, et al. Evidence for lower susceptibility to multiple sclerosis in Japanese-Americans. *Am J Epidemiol*. 1977; 105:303-310.
28. Elian, M, Nightingale, S, and Dean, G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990; 53:906-911.
29. Levin, LI, Munger, KL, Rubertone, MV, et al. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *JAMA*. 2003; 289:1533-1536.

30. Martyn, CN, Cruddas, M, and Compston, DA. Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993; 56:167-168.
31. Gale, CR and Martyn, CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 1995; 47:425-448.
32. Sanders, VJ, Felisan, S, Waddell, A, et al. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. *J Neurovirol*. 1996; 2:249-258.
33. Kristensson, K, Nennesmo, L, Persson, L, et al. Neuron to neuron transmission of herpes simplex virus. Transport of virus from skin to brainstem nuclei. *J Neurol Sci*. 1982; 54:149-156.
34. Carrigan, DR and Knox, KK. Human herpesvirus 6: diagnosis of active infection. *Am Clin Lab*. 2000; 19:12.
35. Soldan, SS, Berti, R, Salem, N, et al. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med*. 1997; 3:1394-1397.
36. Berti, R, Brennan, MB, Soldan, SS, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol*. 2002; 8:250-256.
37. Tait, AR and Straus, SK. Phosphorylation of U24 from Human Herpes Virus type 6 (HHV-6) and its potential role in mimicking myelin basic protein (MBP) in multiple sclerosis. *FEBS Lett*. 2008; 582:2685-2688.
38. Cermelli, C, Berti, R, Soldan, SS, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis*. 2003; 187:1377-1387.
39. Soldan, SS, Leist, TP, Juhng, KN, et al. Increased lymphoproliferative response to human herpesvirus type 6A variant in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2000; 47:306-313.
40. Pietilainen, J, Virtanen, JO, Uotila, L, et al. HHV-6 infection in multiple sclerosis. A clinical and laboratory analysis. *Eur J Neurol*. 2010; 17:506-509.
41. Martinez, A, Alvarez-Lafuente, R, Mas, A, et al. Environment-gene interaction in multiple sclerosis: human herpesvirus 6 and MHC2TA. *Hum Immunol*. 2007; 68:685-689.
42. Munger, KL, Levin, LI, Hollis, BW, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006; 296:2832-2838.

43. Handel, AE, Williamson, AJ, Disanto, G, et al. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS One*. 2011; 6:e16149.
44. Fontoura, P. Monoclonal antibody therapy in multiple sclerosis: Paradigm shifts and emerging challenges. *MAbs*. 2010; 2:670-681.
45. Fernandez-Fernandez, O, Garcia-Trujillo, L, Guerrero-Fernandez, M, et al. The effectiveness of glatiramer acetate in clinical practice: an observational study. *Rev Neurol*. 2012; 54:1-9.
46. Steinman, L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:510-518.
47. Carson, KR, Focosi, D, Major, EO, et al. Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol*. 2009; 10:816-824.
48. Yednock, TA, Cannon, C, Fritz, LC, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992; 356:63-66.
49. PRISMS Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet*. 1998; 352:1498-1504.
50. IFNB MS Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1993; 43:655-661.
51. Johnson, KP, Brooks, BR, Cohen, JA, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995; 45:1268-1276.
52. Jacobs, LD, Cookfair, DL, Rudick, RA, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol*. 1996; 39:285-294.
53. Polman, CH, O'Connor, PW, Havrdova, E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006; 354:899-910.
54. Giovannoni, G, Comi, G, Cook, S, et al. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010; 362:416-426.

55. Kappos, L, Radue, EW, O'Connor, P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2010; 362:387-401.
56. Hartung, HP. New cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after treatment with natalizumab. *Lancet Neurol*. 2009; 8:28-31.
57. Lind, H, von, HA, Major, EO, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab monotherapy. *N Engl J Med*. 2009; 361:1081-1087.
58. Gorelik, L, Lerner, M, Bixler, S, et al. Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann Neurol*. 2010; 68:295-303.
59. Sorensen, PS, Bertolotto, A, Edan, G, et al. Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab. *Mult Scler*. 2012; 18:143-152.
60. Vermersch, P, Kappos, L, Gold, R, et al. Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 2011; 76:1697-1704.
61. Kappos L, Foley J, Gold R, et al. Overview of survival outcome and functional status in postmarketing cases of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Multiple Sclerosis*. 2011; 17:S131.
62. Calabresi, PA, Giovannoni, G, Confavreux, C, et al. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology*. 2007; 69:1391-1403.
63. Perumal J, Hreha S, Bao F, et al. Post-natalizumab associated rebound or CNS immune reconstitution syndrome: clinical and MRI findings. *Multiple Sclerosis*. 2009; 15 (Supp 2):S119 (abstr P418).
64. Stuve, O, Marra, CM, Jerome, KR, et al. Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol*. 2006; 59:743-747.
65. Mancuso, R, Saresella, M, Hernis, A, et al. JC virus detection and JC virus-specific immunity in natalizumab-treated Multiple Sclerosis patients. *J Transl Med*. 2012; 10:248.
66. Stuve, O, Marra, CM, Bar-Or, A, et al. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2006; 63:1383-1387.
67. Kwiatkowski, A, Gallois, J, Bilbault, N, et al. Herpes encephalitis during natalizumab treatment in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012; 18:909-911.
68. Shenoy, ES, Mylonakis, E, Hurtado, RM, et al. Natalizumab and HSV meningoencephalitis. *J Neurovirol*. 2011; 17:288-290.

69. Niino, M, Bodner, C, Simard, ML, et al. Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2006; 59:748-754.
70. Møllergaard, J, Edstrom, M, Vrethem, M, et al. Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. *Mult Scler.* 2010; 16:208-217.
71. Zohren, F, Toutzaris, D, Klarner, V, et al. The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood.* 2008; 111:3893-3895.
72. Belnoue, E, Tougne, C, Rochat, AF, et al. Homing and adhesion patterns determine the cellular composition of the bone marrow plasma cell niche. *J Immunol.* 2012; 188:1283-1291.
73. Carrasco, YR and Batista, FD. B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1. *EMBO J.* 2006; 25:889-899.
74. Krumbholz, M, Meinl, I, Kumpfel, T, et al. Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology.* 2008; 71:1350-1354.
75. Planas, R, Jelcic, I, Schippling, S, et al. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2012; 42:790-798.
76. ASTROM, KE, MANCALL, EL, and RICHARDSON, EP, Jr. Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain.* 1958; 81:93-111.
77. ZURHEIN, G and CHOU, SM. Particles resembling papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science.* 1965; 148:1477-1479.
78. Padgett, BL, Walker, DL, ZurRhein, GM, et al. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet.* 1971; 1:1257-1260.
79. Holman, RC, Torok, TJ, Belay, ED, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States, 1979-1994: increased mortality associated with HIV infection. *Neuroepidemiology.* 1998; 17:303-309.
80. Garcia-Suarez, J, de, MD, Krsnik, I, et al. Changes in the natural history of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-negative lymphoproliferative disorders: impact of novel therapies. *Am J Hematol.* 2005; 80:271-281.
81. Warnatz, K, Peter, HH, Schumacher, M, et al. Infectious CNS disease as a differential diagnosis in systemic rheumatic diseases: three case reports and a review of the literature. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:50-57.

82. Chen, Y, Bord, E, Tompkins, T, et al. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med*. 2009; 361:1067-1074.
83. Carson, KR, Evens, AM, Richey, EA, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood*. 2009; 113:4834-4840.
84. Major, EO, Amemiya, K, Tornatore, CS, et al. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5:49-73.
85. Tan, CS and Koralnik, IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 2010; 9:425-437.
86. Sabath, BF and Major, EO. Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis*. 2002; 186 Suppl 2:S180-S186.
87. Cinque, P, Koralnik, IJ, and Clifford, DB. The evolving face of human immunodeficiency virus-related progressive multifocal leukoencephalopathy: defining a consensus terminology. *J Neurovirol*. 2003; 9 Suppl 1:88-92.
88. Koralnik, IJ. New insights into progressive multifocal leukoencephalopathy. *Curr Opin Neurol*. 2004; 17:365-370.
89. Engsig, FN, Hansen, AB, Omland, LH, et al. Incidence, clinical presentation, and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-infected patients during the highly active antiretroviral therapy era: a nationwide cohort study. *J Infect Dis*. 2009; 199:77-83.
90. Aksamit, AJ. Treatment of non-AIDS progressive multifocal leukoencephalopathy with cytosine arabinoside. *J Neurovirol*. 2001; 7:386-390.
91. Stuve, O, Marra, CM, Cravens, PD, et al. Potential risk of progressive multifocal leukoencephalopathy with natalizumab therapy: possible interventions. *Arch Neurol*. 2007; 64:169-176.
92. White, MK, Gordon, J, Reiss, K, et al. Human polyomaviruses and brain tumors. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 50:69-85.
93. Johnson, EM. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends Microbiol*. 2010; 18:215-223.
94. Allander, T, Andreasson, K, Gupta, S, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol*. 2007; 81:4130-4136.

95. Gaynor, AM, Nissen, MD, Whiley, DM, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 2007; 3:e64.
96. Shishido-Hara, Y. Progressive multifocal leukoencephalopathy and promyelocytic leukemia nuclear bodies: a review of clinical, neuropathological, and virological aspects of JC virus-induced demyelinating disease. *Acta Neuropathol.* 2010; 120:403-417.
97. Jensen, PN and Major, EO. A classification scheme for human polyomavirus JCV variants based on the nucleotide sequence of the noncoding regulatory region. *J Neurovirol.* 2001; 7:280-287.
98. Martin, JD, King, DM, Slauch, JM, et al. Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *J Virol.* 1985; 53:306-311.
99. Sunyaev, SR, Lugovskoy, A, Simon, K, et al. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet.* 2009; 5:e1000368.
100. Khalili, K, White, MK, Lublin, F, et al. Reactivation of JC virus and development of PML in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 2007; 68:985-990.
101. London, WT, Houff, SA, Madden, DL, et al. Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science.* 1978; 201:1246-1249.
102. Walker, DL, Padgett, BL, ZuRhein, GM, et al. Human papovavirus (JC): induction of brain tumors in hamsters. *Science.* 1973; 181:674-676.
103. Yogo, Y, Kitamura, T, Sugimoto, C, et al. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol.* 1990; 64:3139-3143.
104. Agostini, HT, Ryschkewitsch, CF, Singer, EJ, et al. JC virus regulatory region rearrangements and genotypes in progressive multifocal leukoencephalopathy: two independent aspects of virus variation. *J Gen Virol.* 1997; 78 (Pt 3):659-664.
105. Ault, GS. Activity of JC virus archetype and PML-type regulatory regions in glial cells. *J Gen Virol.* 1997; 78 (Pt 1):163-169.
106. Sala, M, Vartanian, JP, Kousignian, P, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: absence of correlation between JC virus neurovirulence and polymorphisms in the transcriptional control region and the major capsid protein loci. *J Gen Virol.* 2001; 82:899-907.
107. Frisque, RJ, Bream, GL, and Cannella, MT. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol.* 1984; 51:458-469.

108. Ault, GS and Stoner, GL. Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure. *J Gen Virol.* 1993; 74 (Pt 8):1499-1507.
109. Elsner, C and Dorries, K. Human polyomavirus JC control region variants in persistently infected CNS and kidney tissue. *J Gen Virol.* 1998; 79 (Pt 4):789-799.
110. Reid, CE, Li, H, Sur, G, et al. Sequencing and analysis of JC virus DNA from natalizumab-treated PML patients. *J Infect Dis.* 2011; 204:237-244.
111. Ferenczy, MW, Marshall, LJ, Nelson, CD, et al. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25:471-506.
112. Daniel, AM, Swenson, JJ, Mayreddy, RP, et al. Sequences within the early and late promoters of archetype JC virus restrict viral DNA replication and infectivity. *Virology.* 1996; 216:90-101.
113. Sock, E, Renner, K, Feist, D, et al. Functional comparison of PML-type and archetype strains of JC virus. *J Virol.* 1996; 70:1512-1520.
114. Elphick, GF, Querbes, W, Jordan, JA, et al. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science.* 2004; 306:1380-1383.
115. Suzuki, S, Sawa, H, Komagome, R, et al. Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology.* 2001; 286:100-112.
116. Kenney, S, Natarajan, V, Strike, D, et al. JC virus enhancer-promoter active in human brain cells. *Science.* 1984; 226:1337-1339.
117. Ravichandran, V and Major, EO. Viral proteomics: a promising approach for understanding JC virus tropism. *Proteomics.* 2006; 6:5628-5636.
118. Wuthrich, C, Dang, X, Westmoreland, S, et al. Fulminant JC virus encephalopathy with productive infection of cortical pyramidal neurons. *Ann Neurol.* 2009; 65:742-748.
119. Koralnik, IJ, Wuthrich, C, Dang, X, et al. JC virus granule cell neuronopathy: A novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol.* 2005; 57:576-580.
120. Richardson-Burns, SM, Kleinschmidt-DeMasters, BK, DeBiasi, RL, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy and apoptosis of infected oligodendrocytes in the central nervous system of patients with and without AIDS. *Arch Neurol.* 2002; 59:1930-1936.
121. Yang, B and Prayson, RA. Expression of Bax, Bcl-2, and P53 in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Mod Pathol.* 2000; 13:1115-1120.

122. Seth, P, Diaz, F, Tao-Cheng, JH, et al. JC virus induces nonapoptotic cell death of human central nervous system progenitor cell-derived astrocytes. *J Virol.* 2004; 78:4884-4891.
123. Pina-Oviedo, S, Urbanska, K, Radhakrishnan, S, et al. Effects of JC virus infection on anti-apoptotic protein survivin in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Am J Pathol.* 2007; 170:1291-1304.
124. Knowles, WA, Pipkin, P, Andrews, N, et al. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol.* 2003; 71:115-123.
125. Padgett, BL and Walker, DL. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis.* 1973; 127:467-470.
126. Seth, P, Diaz, F, and Major, EO. Advances in the biology of JC virus and induction of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol.* 2003; 9:236-246.
127. Bofill-Mas, S, Clemente-Casares, P, Major, EO, et al. Analysis of the excreted JC virus strains and their potential oral transmission. *J Neurovirol.* 2003; 9:498-507.
128. Dubois, V, Dutronc, H, Lafon, ME, et al. Latency and reactivation of JC virus in peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2288-2292.
129. Gallia, GL, Houff, SA, Major, EO, et al. Review: JC virus infection of lymphocytes--revisited. *J Infect Dis.* 1997; 176:1603-1609.
130. Houff, SA, Major, EO, Katz, DA, et al. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 1988; 318:301-305.
131. Tornatore, C, Berger, JR, Houff, SA, et al. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol.* 1992; 31:454-462.
132. Kitamura, T, Aso, Y, Kuniyoshi, N, et al. High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J Infect Dis.* 1990; 161:1128-1133.
133. Yogo, Y, Kitamura, T, Sugimoto, C, et al. Sequence rearrangement in JC virus DNAs molecularly cloned from immunosuppressed renal transplant patients. *J Virol.* 1991; 65:2422-2428.
134. Bofill-Mas, S and Girones, R. Excretion and transmission of JCV in human populations. *J Neurovirol.* 2001; 7:345-349.

135. Monaco, MC, Jensen, PN, Hou, J, et al. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J Virol.* 1998; 72:9918-9923.
136. Kato, A, Kitamura, T, Takasaka, T, et al. Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J Neurovirol.* 2004; 10:244-249.
137. Ricciardiello, L, Chang, DK, Laghi, L, et al. Mad-1 is the exclusive JC virus strain present in the human colon, and its transcriptional control region has a deleted 98-base-pair sequence in colon cancer tissues. *J Virol.* 2001; 75:1996-2001.
138. Laghi, L, Randolph, AE, Chauhan, DP, et al. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:7484-7489.
139. Dorries, K, Vogel, E, Gunther, S, et al. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology.* 1994; 198:59-70.
140. Azzi, A, De, SR, Ciappi, S, et al. Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J Neurovirol.* 1996; 2:411-416.
141. Tan, CS, Dezube, BJ, Bhargava, P, et al. Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. *J Infect Dis.* 2009; 199:881-888.
142. Delbue, S, Branchetti, E, Boldorini, R, et al. Presence and expression of JCV early gene large T Antigen in the brains of immunocompromised and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2008; 80:2147-2152.
143. Elsner, C and Dorries, K. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology.* 1992; 191:72-80.
144. Perez-Liz, G, Del, VL, Gentilella, A, et al. Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Ann Neurol.* 2008; 64:379-387.
145. White, FA, III, Ishaq, M, Stoner, GL, et al. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol.* 1992; 66:5726-5734.
146. White, MK and Khalili, K. Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy--revisited. *J Infect Dis.* 2011; 203:578-586.
147. Yogo, Y, Zhong, S, Shibuya, A, et al. Transcriptional control region rearrangements associated with the evolution of JC polyomavirus. *Virology.* 2008; 380:118-123.

148. Ciappi, S, Azzi, A, De, SR, et al. Archetypal and rearranged sequences of human polyomavirus JC transcription control region in peripheral blood leukocytes and in cerebrospinal fluid. *J Gen Virol.* 1999; 80 (Pt 4):1017-1023.
149. Tan, CS, Chen, Y, Viscidi, RP, et al. Discrepant findings in immune responses to JC virus in patients receiving natalizumab. *Lancet Neurol.* 2010; 9:565-566.
150. Pietropaolo, V, Videtta, M, Fioriti, D, et al. Rearrangement patterns of JC virus noncoding control region from different biological samples. *J Neurovirol.* 2003; 9:603-611.
151. Vaz, B, Cinque, P, Pickhardt, M, et al. Analysis of the transcriptional control region in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol.* 2000; 6:398-409.
152. Ferrante, P, Delbue, S, Pagani, E, et al. Analysis of JC virus genotype distribution and transcriptional control region rearrangements in human immunodeficiency virus-positive progressive multifocal leukoencephalopathy patients with and without highly active antiretroviral treatment. *J Neurovirol.* 2003; 9 Suppl 1:42-46.
153. Marzocchetti, A, Wuthrich, C, Tan, CS, et al. Rearrangement of the JC virus regulatory region sequence in the bone marrow of a patient with rheumatoid arthritis and progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol.* 2008; 14:455-458.
154. Newman, JT and Frisque, RJ. Detection of archetype and rearranged variants of JC virus in multiple tissues from a pediatric PML patient. *J Med Virol.* 1997; 52:243-252.
155. Delbue, S, Sotgiu, G, Fumagalli, D, et al. A case of a progressive multifocal leukoencephalopathy patient with four different JC virus transcriptional control region rearrangements in cerebrospinal fluid, blood, serum, and urine. *J Neurovirol.* 2005; 11:51-57.
156. Jing, D, Oelschlaegel, U, Ordemann, R, et al. CD49d blockade by natalizumab in patients with multiple sclerosis affects steady-state hematopoiesis and mobilizes progenitors with a distinct phenotype and function. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45:1489-1496.
157. Major, EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med.* 2010; 61:35-47.
158. Monaco, MC, Atwood, WJ, Gravell, M, et al. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J Virol.* 1996; 70:7004-7012.
159. von, LD, Meyer-Koenig, U, Serr, A, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow. *Blood.* 1995; 86:4086-4090.

160. Winklhofer, KF, Albrecht, I, Wegner, M, et al. Human cytomegalovirus immediate-early gene 2 expression leads to JCV replication in nonpermissive cells via transcriptional activation of JCV T antigen. *Virology*. 2000; 275:323-334.
161. Yao, K, Gagnon, S, Akhyani, N, et al. Reactivation of human herpesvirus-6 in natalizumab treated multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2008; 3:e2028.
162. Walker, DL and Padgett, BL. The epidemiology of human polyomaviruses. *Prog Clin Biol Res*. 1983; 105:99-106.
163. Kean, JM, Rao, S, Wang, M, et al. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009; 5:e1000363.
164. Grabowski, MK, Viscidi, RP, Margolick, JB, et al. Investigation of pre-diagnostic virological markers for progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Virol*. 2009; 81:1140-1150.
165. Antonsson, A, Green, AC, Mallitt, KA, et al. Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians. *J Gen Virol*. 2010; 91:1849-1853.
166. Matos, A, Duque, V, Beato, S, et al. Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. *J Med Virol*. 2010; 82:494-504.
167. Ryschkewitsch, CF, Jensen, PN, Monaco, MC, et al. JC virus persistence following progressive multifocal leukoencephalopathy in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol*. 2010; 68:384-391.
168. Major, EO. History and current concepts in the pathogenesis of PML. *Cleve Clin J Med*. 2011; 78 Suppl 2:S3-S7.
169. Koralnik, IJ. Overview of the cellular immunity against JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol*. 2002; 8 Suppl 2:59-65.
170. Koralnik, IJ, Du Pasquier, RA, Kuroda, MJ, et al. Association of prolonged survival in HLA-A2+ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. *J Immunol*. 2002; 168:499-504.
171. Du Pasquier, RA, Kuroda, MJ, Schmitz, JE, et al. Low frequency of cytotoxic T lymphocytes against the novel HLA-A*0201-restricted JC virus epitope VP1(p36) in patients with proven or possible progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol*. 2003; 77:11918-11926.
172. Haghikia, A, Perrech, M, Pula, B, et al. Functional energetics of CD4+-cellular immunity in monoclonal antibody-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in autoimmune disorders. *PLoS One*. 2011; 6:e18506.

173. Gasnault, J, Kahraman, M, de Goer de Herve MG, et al. Critical role of JC virus-specific CD4 T-cell responses in preventing progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS*. 2003; 17:1443-1449.
174. Berger, JR. JCV-specific CD4 T cell response: another piece of the puzzle in explaining some aspects of AIDS associated PML. *AIDS*. 2003; 17:1557-1559.
175. Kalams, SA and Walker, BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 1998; 188:2199-2204.
176. Aly, L, Yousef, S, Schippling, S, et al. Central role of JC virus-specific CD4+ lymphocytes in progressive multi-focal leukoencephalopathy-immune reconstitution inflammatory syndrome. *Brain*. 2011; 134:2687-2702.
177. Lehmann, HC, Hartung, HP, Hetzel, GR, et al. Plasma exchange in neuroimmunological disorders: part 2. Treatment of neuromuscular disorders. *Arch Neurol*. 2006; 63:1066-1071.
178. Watzinger, F, Suda, M, Preuner, S, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:5189-5198.
179. Zivkovic, M, Stankovic, A, Dincic, E, et al. The tag SNP for HLA-DRB1*1501, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: cost-effective high-throughput detection by real-time PCR. *Clin Chim Acta*. 2009; 406:27-30.
180. Goris, A, Walton, A, Ban, M, et al. A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1*1501 allele. *Tissue Antigens*. 2008; 72:401-403.
181. Plavina, T, Berman, M, Njenga, M, et al. Multi-site analytical validation of an assay to detect anti-JCV antibodies in human serum and plasma. *J Clin Virol*. 2012; 53:65-71.
182. Agostini, HT, Ryschkewitsch, CF, and Stoner, GL. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:159-164.
183. Ling, PD, Lednicky, JA, Keitel, WA, et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. *J Infect Dis*. 2003; 187:1571-1580.
184. Rossi, A, Delbue, S, Mazziotti, R, et al. Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of Italian immunocompetent subjects. *J Med Virol*. 2007; 79:408-412.

185. Egli, A, Infanti, L, Dumoulin, A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis.* 2009; 199:837-846.
186. Rudick, RA, O'Connor, PW, Polman, CH, et al. Assessment of JC virus DNA in blood and urine from natalizumab-treated patients. *Ann Neurol.* 2010; 68:304-310.
187. Jilek, S, Jaquiere, E, Hirsch, HH, et al. Immune responses to JC virus in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab: a cross-sectional and longitudinal study. *Lancet Neurol.* 2010; 9:264-272.
188. Lonergan, RM, Carr, MJ, De Gascun, CF, et al. Reactivation of BK polyomavirus in patients with multiple sclerosis receiving natalizumab therapy. *J Neurovirol.* 2009; 15:351-359.
189. Warnke, C, Smolianov, V, Dehmel, T, et al. CD34+ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus. *Mult Scler.* 2011; 17:151-156.
190. Rinaldi, L, Rinaldi, F, Perini, P, et al. No evidence of JC virus reactivation in natalizumab treated multiple sclerosis patients: an 18 month follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2010; 81:1345-1350.
191. Sadiq, SA, Puccio, LM, and Brydon, EW. JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J Neurol.* 2010; 257:954-958.
192. Laroni, A, Giacomazzi, CG, Grimaldi, L, et al. Urinary JCV-DNA testing during natalizumab treatment may increase accuracy of PML risk stratification. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012; 7:665-672.
193. Trampe, AK, Hemmelmann, C, Stroet, A, et al. Anti-JC virus antibodies in a large German natalizumab-treated multiple sclerosis cohort. *Neurology.* 2012; 78:1736-1742.
194. Berger, JR, Houff, SA, Gurwell, J, et al. JC virus antibody status underestimates infection rates. *Ann Neurol.* 2013.
195. Lee, P, Plavina, T, Castro, A, et al. A second-generation ELISA (STRATIFY JCV DxSelect) for detection of JC virus antibodies in human serum and plasma to support progressive multifocal leukoencephalopathy risk stratification. *J Clin Virol.* 2013; 57:141-146.
196. Hill, AV, Yates, SN, Allsopp, CE, et al. Human leukocyte antigens and natural selection by malaria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994; 346:379-385.
197. McAulay, KA, Higgins, CD, Macsween, KF, et al. HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. *J Clin Invest.* 2007; 117:3042-3048.

198. Thio, CL, Thomas, DL, Karacki, P, et al. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2003; 77:12083-12087.
199. Gao, X, Nelson, GW, Karacki, P, et al. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med.* 2001; 344:1668-1675.
200. Ali, L, Mansoor, A, Ahmad, N, et al. Patient HLA-DRB1* and -DQB1* allele and haplotype association with hepatitis C virus persistence and clearance. *J Gen Virol.* 2010; 91:1931-1938.
201. Perkins, MR, Ryschkewitsch, C, Liebner, JC, et al. Changes in JC Virus-Specific T Cell Responses during Natalizumab Treatment and in Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1003014.
202. Selter, RC, Biberacher, V, Grummel, V, et al. Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2013.
203. Braun, DK, Dominguez, G, and Pellett, PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10:521-567.
204. Steeper, TA, Horwitz, CA, Ablashi, DV, et al. The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human herpesvirus-6 (HHV-6) in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Am J Clin Pathol.* 1990; 93:776-783.
205. Kondo, K, Kondo, T, Okuno, T, et al. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol.* 1991; 72 (Pt 6):1401-1408.
206. Mock, DJ, Powers, JM, Goodman, AD, et al. Association of human herpesvirus 6 with the demyelinating lesions of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol.* 1999; 5:363-373.
207. Blumberg, BM, Mock, DJ, Powers, JM, et al. The HHV6 paradox: ubiquitous commensal or insidious pathogen? A two-step in situ PCR approach. *J Clin Virol.* 2000; 16:159-178.
208. Ricciardiello, L, Laghi, L, Ramamirtham, P, et al. JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2000; 119:1228-1235.
209. Du Pasquier, RA, Kuroda, MJ, Zheng, Y, et al. A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain.* 2004; 127:1970-1978.
210. Taoufik, Y, Gasnault, J, Karaterki, A, et al. Prognostic value of JC virus load in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis.* 1998; 178:1816-1820.

211. Taoufik, Y, Delfraissy, JF, and Gasnault, J. Highly active antiretroviral therapy does not improve survival of patients with high JC virus load in the cerebrospinal fluid at progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosis. *AIDS*. 2000; 14:758-759.
212. Marshall, LJ, Moore, LD, Mirsky, MM, et al. JC virus promoter/enhancers contain TATA box-associated Spi-B-binding sites that support early viral gene expression in primary astrocytes. *J Gen Virol*. 2012; 93:651-661.
213. Houff, SA and Berger, JR. The bone marrow, B cells, and JC virus. *J Neurovirol*. 2008; 14:341-343.
214. Gosert, R, Kardas, P, Major, EO, et al. Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. *J Virol*. 2010; 84:10448-10456.
215. Pfister, LA, Letvin, NL, and Koralnik, IJ. JC virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol*. 2001; 75:5672-5676.
216. Iida, T, Kitamura, T, Guo, J, et al. Origin of JC polyomavirus variants associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:5062-5065.
217. Flaegstad, T, Sundsfjord, A, Arthur, RR, et al. Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. *Virology*. 1991; 180:553-560.
218. White, MK and Khalili, K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology*. 2004; 324:1-16.
219. Brew, BJ, Davies, NW, Cinque, P, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol*. 2010; 6:667-679.
220. Soulas-Sprauel, P, Rivera-Munoz, P, Malivert, L, et al. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene*. 2007; 26:7780-7791.